

LACTOFERRIN, EIN MARKERPROTEIN BEI ERKRANKUNGEN DER PROSTATA

Christa Mühlbacher Nickl



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554616_0043

Aus dem
Institut für Physiologische Chemie
Physikalische Biochemie
und Zellbiologie der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. E.M. Klingenberg
Prof. Dr. W. Neupert
Prof. Dr. H.G. Zachau

**LACTOFERRIN, EIN MARKERPROTEIN
BEI ERKRANKUNGEN DER PROSTATA**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
und der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christa Mühlbacher Nickl

aus
München

Jahr

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W.G.K. Krietsch

Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr. M. Knedel
2. Prof. Dr. G. Staehler

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. G. Mühlhofer

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.1987

Mein Dank gilt allen, die am Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren, insbesondere jedoch Herrn Prof. Dr. Wolfgang K.G. Krietsch, dessen Ratschläge und Unterstützung nicht nur für die vorliegende Arbeit von Bedeutung waren.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Reinhard Uffhausen für die statistische Bearbeitung der Daten bedanken und bei Frau Gesa Haedenkamp für Ihre Unterstützung bei der Ausarbeitung des ELISA-Tests.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Rainer Nickl, ohne dessen Geduld diese Arbeit in den Untiefen der "LISA Apple Computer" Festplatte verschwunden wäre.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	2
METHODEN	5
EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	14
1. Affinitäts-Chromatographie von Lactoferrin über verschiedene Sepharose Gele	14
1.1. Chromatographie über Spacer-Sepharose mit einem NaCl-Gradienten	14
1.2. Bindung von Lactoferrin an verschiedene Liganden	16
1.3. Rechromatographie der beiden Lactoferrin-Peaks	22
1.4. Chromatographie über ATP-Sepharose nach Dialyse gegen ATP, Adenosin und Uridin	23
2. Einflüsse der Eisen-Konzentration auf die Affinitäts-Chromatographie von Lactoferrin über ATP-Sepharose und auf den ELISA-Test	26
3. pH-Abhängigkeit der Bindung von Lactoferrin an ATP-Sepharose	28
4. Affinitäts-chromatographische Isolierung von Lactoferrin aus Human Seminalplasma	30
5. Spaltung von DNA-und RNA Komplexen durch Lactoferrin in Gegenwart von H_2O_2	36
6. Lactoferrin als Markerprotein urologischer Erkrankungen	37
6.1. Lactoferrin im Plasma	38
6.2. Lactoferrin in Prostatagewebe	41
6.3. Statistische Auswertung der Daten	44
6.4. Lactoferrin in der Zellkultur von Prostakarzinomzellen	47
DISKUSSION	49
AUSBLICK	65
ZUSAMMENFASSUNG	66
MATERIALIEN	68
ABKÜRZUNGEN	69
LITERATUR	70

EINLEITUNG

Der erste Nachweis eines eisenbindenden Proteins gelang Soerensen aus Rindermilch im Jahre 1939 (56). 1951 wurde dieses Protein auch in Humanmilch durch Schäfer (55) entdeckt. Die Autoren nannten es Lactotransferrin oder Lactoferrin, da es wie das Transferrin des Plasmas die Fähigkeit besitzt, reversibel zwei Atome Eisen zu binden.

In der Zwischenzeit wurden Lactoferrin und Transferrin intensiv untersucht und es ist mittlerweile bekannt, daß neben der analogen Funktion auch weitgehende Übereinstimmung der chemischen Struktur besteht. Beides sind Glycoproteine mit nahezu identischen Molekulargewichten, sowie in weiten Bereichen homologen Aminosäuresequenzen (16). Jedoch unterscheiden sich Lactoferrin und Transferrin in ihren antigenen Eigenschaften, in der Lokalisation und Komposition der prosthetischen Zuckergruppen und in der unterschiedlichen Affinität für Eisen (11,28).

Lactoferrin konnte in den meisten Körpersekreten extrazellulär nachgewiesen werden. Es ist enthalten in den Sekreten der Bronchien, Nase und Parotis (48), des Magens, Pankreas (25) und Duodenums (27), weiterhin in Tränenflüssigkeit, Galle und Ascites, sowie in den Sekreten der proximalen Nierentubuli, im Urin, Seminalplasma und Sekret der Uterusmukosa (48).

Das Lactoferrin des Plasmas stammt zum größten Teil aus den neutrophilen Granulozyten. Es ist dort in spezifischen Granulae lokalisiert und wird während der Phagozytose synchron mit den lysosomalen Proteinen freigesetzt (16). Dieser Sekretionsmechanismus und die Fähigkeit Eisen zu binden, ließen schon früh vermuten, daß Lactoferrin eine antiinfektiöse und antibakterielle Aktivität besitzt.

Eine Beteiligung an der normalen Immunabwehr wurde auch durch die Beobachtung unterstützt, daß ein Mangel, oder das völlige Fehlen von Lactoferrin mit chronisch bakteriellen Infektionen, wie multiplen Hautabszessen und mit einer Dysfunktion der neutrophilen Granulozyten assoziiert ist. In der Literatur sind einige Personen mit angeborener Lactoferrin-Defizienz beschrieben, bei denen derartige Krankheitsbilder beobachtet wurden (19).

Neben einer direkt bacteriostatischen und bacteriziden Wirkung, beispielsweise gegen *Streptococcus mutans* und *Vibrio cholerae* (3), konnte auch eine über andere Mechanismen gesteuerte akut entzündungshemmende Funktion von Lactoferrin nachgewiesen werden (16). In vitro Untersuchungen, sowie die Beobachtungen an Patienten mit Lactoferrin-Defizienz legten nahe, daß eine ausreichende Plasmakonzentration von Lactoferrin für die Ausbildung der negativen Ladung der Plasmamembran neutrophiler Granulozyten notwendig ist. Diese bewirkt die Steuerung der Chemotaxis, Zelladhäsion- und aggregation der neutrophilen Granulozyten (14,52), und bildet somit die Voraussetzung für eine Zellmigration und den Verbleib der Leukozyten in entzündetem Gewebe.

Die antiinfektiöse Wirkung ist jedoch nicht die einzige Funktion von Lactoferrin, vielmehr ist dieses Protein in eine Reihe weiterer biologischer Prozesse involviert, wie die Regulation der Myelopoese, die Regulation intestinaler Eisenabsorption und die Entstehung einer Eisenmangelanämie bei chronischen Entzündungen (15). Über die genauen Mechanismen der Lactoferrinwirkung ist vielfach noch wenig bekannt, sie sind jedoch Gegenstand intensiver Untersuchungen.

Aufgrund der Beteiligung von Lactoferrin an den genannten biologischen Prozessen, bietet sich die Möglichkeit, dieses Protein als diagnostischen Marker einzusetzen. In der Literatur finden sich mehrere Studien über Lactoferrin als Indikatorprotein für benigne und maligne Erkrankungen.

Den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit bildete die Beobachtung, daß bei verschiedenen Erkrankungen der Prostata und der ableitenden Harnwege, die Lactoferrin-Konzentration des Plasmas verändert war. In den von uns durchgeführten Untersuchungen sollte geprüft werden, ob Lactoferrin bei Erkrankungen der Prostata spezifischen Konzentrationsveränderungen im Plasma und Prostatagewebe unterliegt und inwiefern diese Veränderungen als Diagnosekriterien für benigne und maligne Erkrankungen hilfreich sein könnten.

Es sollte eine neue Reinigungsmethode erarbeitet werden, bei der Lactoferrin aus Seminalplasma mit Hilfe von Affinitäts-Chromatographie über ATP-Sepharose vorgereinigt wird.

In diesem Zusammenhang entstanden Daten über die Bindung von Lactoferrin an Nucleinsäuren. Diese Ergebnisse könnten möglicherweise zur Aufklärung des Funktionsmechanismus bisher unklarer Lactoferrin-Wirkungen beitragen, welche mit der Interaktion an Desoxyribonucleinsäure einhergehen.

Für das Verständnis der biologischen Effekte von Lactoferrin ist es wichtig, eine genaue und sensitive Nachweismethode zu besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein von Engvall (26) beschriebener ELISA-Test modifiziert, der diese Anforderungen zufriedenstellend erfüllen konnte.

METHODEN

Proben

Humanplasma wurde in verschiedenen Kliniken aus Citratblut gewonnen und im gefrorenen Zustand erhalten.

Seminalplasma wurde aus Humansperma, das von verschiedenen Spendern vereinigt wurde, durch Zentrifugation (5 Minuten, bei 29000 g) gewonnen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Gewebeproben wurden als ganze Teile in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Medium von Gewebekulturen wurde in gefrorenem Zustand erhalten.

Lagerung der Proben: Blut- und Seminalplasmen, sowie Gewebeproben wurden bei -24°C aufbewahrt. Gereinigtes LF wurde in einer Ammoniumsulfat-Dialyse ausgefällt und in diesem Zustand bei 4°C aufbewahrt. Die Einfrierdauer aller Proben war ohne Einfluß auf den LF-Nachweis im ELISA-Test.

Puffer und Dialysen

Puffer A: 50 mM Tris, 5 mM MgSO_4 , bei 4°C mit HCl konz. auf pH 7,8 eingestellt, entgast

Puffer B: wie Puffer A, pH 8,6

Puffer C: 50 mM Imidazol, 5 mM MgSO_4 , bei 4°C mit HCl Konz. auf pH 6,0 eingestellt, entgast

Lösungen und Puffer für den ELISA-Test:

- Puffer D: 0,1 M NaHCO_3 , bei 4 °C mit NaOH konz. auf pH 9,6 eingestellt
- Puffer E: 0,01 M NaH_2PO_4 , 0,01 M Na_2HPO_4 , 0,05 % Tween 20, bei 4 °C mit NaOH konz. auf pH 7,2 eingestellt
- Puffer F: wie Puffer E, ohne Tween 20
- Puffer G: 1,0 M Diäthanolamin, eingestellt bei Raumtemperatur mit NaOH konz. auf pH 9,8
- Waschlösung: 0,15 M NaCl, 0,05 % Tween 20

Ammoniumsulfat-Dialyse:

Dialyse über 12 Stunden, bei 4 °C, gegen 100-fachen Überschuß an gesättigter Ammoniumsulfatlösung in 50 mM Tris, pH 8,0 bei 4 °C mit HCl konz. eingestellt.

Sonstige Dialysen:

Bei 4 °C gegen 500-fachen Überschuß an Puffer A für 6-20 Stunden.

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen wurden mit zwei verschiedenen Methoden gemessen.

War die Proteinkonzentration von verunreinigten LF-Lösungen zu bestimmen, so wurde dies mit der Biuret-Methode nach Beisenherz et al. (6) mit 1/10 der dort angegebenen Volumina durchgeführt.

Die Proteinkonzentrationen nach Affinitäts-Chromatographie und die Konzentrationen reiner LF-Lösungen wurden photometrisch durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Bei einem Lichtweg von 1 cm wurde ein Extinktionskoeffizient von $E_{1\%}^{1\text{cm}}_{280\text{ nm}} = 11,7$ (29) zugrunde gelegt.

Affinitäts-Chromatographie mit ATP-Sepharose

Lactoferrin adsorbiert wegen seiner Affinität zum Nucleotidliganden spezifisch an ATP-ribosyl-adipoyl-dihydrazo-Sepharose (ATP-Sepharose). Dieses Gel wurde nach der Methode von Kuntz et al.(40), hergestellt, und zur Chromatographie von LF verwendet. Alle Chromatographien wurden bei 4 °C durchgeführt. Das Gel besaß bei 2 - 5 maliger Verwendung optimale Bindungseigenschaften. Zur Regeneration wurden die benützten Gele in einer 4 M Harnstofflösung, welche 2 % (w/v) Natriumdodecylsulfat enthielt, 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf einer Glasfritte mit Aqua dest. und Puffer A gewaschen. Nach dem Absaugen von überschüssiger Flüssigkeit wurde das Gel bei 4 °C aufbewahrt.

Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Polyacrylamidgel wurde modifiziert nach Laemmli (41) hergestellt. Die Elektrophorese wurde bei 4 °C in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat durchgeführt (SDS-PAGE). Es wurde ein Plattengel der Dimensionen 120 mm x 115 mm x 2 mm (LxBxD) verwendet. Die Laufzeit betrug 8 Stunden, die Spannung war 200 V.

Laufpuffer:	Tris	0,025 M pH 8,3 mit HCl konz., bei 4 °C eingestellt
	Glycin	0,195 M
	SDS	0,1 %
Probenpuffer:	Tris	0,065 M pH 6,8 mit HCl konz., bei 24 °C eingestellt
	SDS	3 %
	Mercaptoäthanol	5 %
	Glycerin	10 %
Laufgel:	Tris	0,37 M
	SDS	0,1 %
	Acrylamid	10 %
	Bisacrylamid	0,27 %
	Persulfat	0,015 %
	TMED	0,0125 %

Pro Geltasche wurden maximal 100 µg Protein in 10 - 100 µl Probenvolumen aufgetragen. Die Gele wurden über Nacht mit 0,025 % (w/v) Coomassie brilliant blue, gelöst in Methanol/ Eisessig/ Wasser (10/2/10; v/v/v), gefärbt und schließlich wieder mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch entfärbt.

ELISA-Test (Enzyme- linked immunosorbent assay)

Dem ELISA-Test lag eine von Engvall (26) beschriebene Methode zugrunde, die in einigen Punkten modifiziert wurde.

Spezifische Antikörper wurden durch passive Adsorption an einen festen Träger gekoppelt und danach mit dem korrespondierenden Antigen (LF) inkubiert.

Von den gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexen wurden die ungebundenen Antigen- und Antikörper- Partikel abgetrennt, danach

nochmals mit Enzym-markiertem spezifischen Antikörper inkubiert und die Aktivität des gebundenen Antikörper-Enzym-Konjugates photometrisch gemessen.

Der Test wurde nicht kompetitiv durchgeführt ("Sandwich Methode"). Dies bedeutet, daß die Inkubationen mit dem zu testenden Antigen der Proben und dem enzymgekoppelten Antikörper voneinander getrennt stattfanden. Dadurch konnten Proteasen und Enzyminhibitoren der untersuchten Sekrete die Enzymaktivität nicht beeinträchtigen.

Als Nachweisenzym verwendeten wir alkalische Phosphatase, da dieses Enzym den von Engvall (26) genannten Kriterien, wie hohe spezifische Aktivität, keine Fremdaktivität und hochsensitive Nachweisbarkeit des Produktes, entsprach.

Proteine adsorbieren unspezifisch an die als Festphase verwendeten Polystyren Mikrotiterplatten (26). Aus diesem Grunde wurden die Inkubationen des Antigens und des Enzymkonjugates, sowie alle Waschvorgänge, mit 0,05 % Tween 20 durchgeführt. Dieses nicht-ionische Detergenz reduziert hydrophobe Interaktionen zwischen Proteinen und der Festphase, und vermindert damit die unspezifische Adsorption von Antigen und Antikörper-Enzymkomplex. Zwischen der Antigen-Antikörper Bindung und Tween 20 bestand jedoch keine Wechselwirkung (26).

1. Reinigung der IgG-Fraktion von Antiserum gegen Human-Lactoferrin aus Kaninchen

Spezifisches Anti-Human-Lactoferrin IgG wurde aus käuflichem Kaninchen-Antiserum durch Affinitäts-Chromatographie über Protein A-Sepharose CL-4B gewonnen.

Ein Volumen von 2 ml Protein A-Sepharose CL-4B-Gel wurde mit Puffer F gewaschen, dekantiert und mit 1 ml Antiserum im Batch-verfahren vereinigt.

Gel und Antiserum wurden 45 Minuten bei 4 °C sanft geschüttelt und danach in eine Chromatographie-Säule transferiert. Die nachfolgenden Arbeitsschritte entsprachen dem von Engvall (26) beschriebenen Reinigungsverfahren.

2. Konjugation von Anti-Human-Lactoferrin Immunglobulin G mit alkalischer Phosphatase

Die Konjugation von alkalischer Phosphatase an den Antikörper wurde ebenfalls nach der Methode von Engvall (26) durchgeführt, wobei Glutardialdehyd als kreuzreagierendes Kopplungsreagenz verwendet wurde. Die Aktivität des gebildeten Enzym-Antikörper-Konjugates wurde in einem separaten ELISA-Test mit Verdünnungen bekannter Antikörper- und Lactoferrinkonzentrationen untersucht.

Das Konjugat wurde bei 4 °C in Puffer F aufbewahrt, welchem für Stabilität und Haltbarkeit des Enzyms 5 % Rinderserumalbumin und 0,02 % NaN_3 zugesetzt worden waren. Unter diesen Bedingungen blieb die Enzymaktivität über mehrere Monate stabil.

3. ELISA-Test

Alle LF-Konzentrationen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Hilfe dieses Testes nach Engvall (26) bestimmt. Für die Kopplung des Antikörpers an den festen Träger wurden 200 µl Aliquots der gereinigten Anti-LF IgG-Lösung in einer Konzentration von 2 µg Protein/ml in Puffer D, in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert und 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Diese und alle weiteren Inkubationen fanden in einer feuchten Kammer statt.

Anschließend wurden die Proben durch Umdrehen geleert, auf Zellstoff trocken geklopft und je Vertiefung mit 200 µl 9 % BSA in Puffer D für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Reaktion mit BSA, sowie zwischen allen weiteren Bindungsprozeduren wurden die Platten gewaschen. Dies sollte, wie auch die Inkubation mit BSA, die unspezifische Bindung anderer Komponenten an den festen Träger reduzieren.

Für den Waschvorgang wurden die Vertiefungen für 2-3 Minuten mit Waschlösung gefüllt und die Platten je 3 mal wie beschrieben geleert und getrocknet.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden die LF-Proben, sowie eine LF-Standardlösung aufgetragen. Für jede Platte wurde mit 11 Serienverdünnungen von gereinigtem LF in Puffer E eine Standardkurve erstellt, mit LF-Testkonzentrationen zwischen 2 ng/ml - 2000 ng/ml. Jede Platte enthielt 2 Vertiefungen mit Puffer E ohne LF als Leerwert. Von den zu untersuchenden Proben wurden je 100 µl Aliquots von vier verschiedenen Verdünnungen in Puffer E als Duplikate gemessen.

Die Proben wurden mindestens zweimal gemessen und folgendermaßen verdünnt:

Blutplasma:	1:10	bis	1:80
Seminalplasma:	1:10000	bis	1:80000
Prostatagewebe	1:400	bis	1:3000
Kulturmedium:	1:2		

Die Proben wurden 3 Stunden bei 37° C inkubiert, dann wurden die Platten gewaschen und anschließend wurden 200 µl Aliquots der Konjugatverdünnung aufgetragen, 17 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und wieder gewaschen.

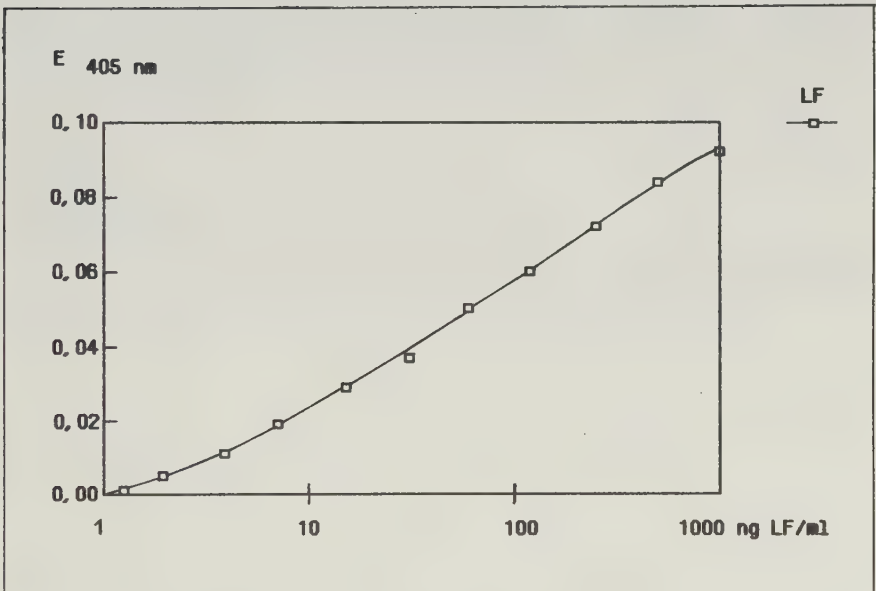
Im letzten Arbeitsgang wurde die gebundene Enzymaktivität durch Zugabe eines chromogenen Substrates quantifiziert. Hierfür wurden 200 µl Para-nitrophenylphosphat als stabiles und lösliches Substrat der alkalischen Phosphatase in einer Konzentration von 1 g/l in Puffer G in die Vertiefungen pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Alkalische Phosphatase hydrolysiert gebundenes Phosphat und setzt damit den gelben p-Nitrophenolat-Komplex frei. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 2 N NaOH pro Vertiefung gestoppt und die Absorption des gelben Farbstoffes bei 405 nm in einem für die Messung von Mikrotiterplatten umgebauten Photometer gegen den antigenfreien Leerwert gemessen.

Die LF-Konzentrationen der Proben wurden an der Standardkurve abgelesen.

Die Dosis-Wirkungskurve ergab sich aus dem Auftragen der Absorption bei 405 nm gegen die Standard LF-Konzentration im halb-logarithmischen Maßstab. Abbildung 1 zeigt eine typische Standardkurve mit einem linearen Bereich zwischen 4-500 ng LF/ml. Der sigmoide Kurvenverlauf im Bereich höherer Konzentrationen kann auf die limittierende Wirkung der Konzentrationen von Antikörper und/oder Konjugat zurückzuführen sein.

Abb.1: Lactoferrin Standardkurve für den ELISA-Test



Nachfolgend sollen noch einige Qualitätskriterien des verwendeten ELISA-Testes zusammengestellt werden.

Mit einer unteren Nachweisgrenze für LF von 1-2 µg/l war der Test für die untersuchten Proben ausreichend empfindlich.

Die Spezifität wurde durch Zugabe von Transferrin, anstelle von LF, in einer Testkonzentration von 2000 ng/ml gemessen. Transferrin bewirkte keine gegenüber dem Leerwert erhöhte Lichtabsorption, sodaß eine Kreuzreaktion zwischen Transferrin und Anti-LF- Antikörper ausgeschlossen werden konnte.

Die Ausbeute der ELISA-Bestimmung wurde mit gereinigtem, käuflichen LF aus Humanmilch bestimmt. Verglichen mit Konzentrationsmessungen durch Absorption bei 280 nm und mit der Biuret-Methode lag die Ausbeute des ELISA-Tests bei 100 %.

Weiterhin wurden Reproduzierbarkeit und Präzision des Tests bestimmt. Die Intertest-Variation wurde für 10 Plasmen ermittelt, von denen jeweils 4 Aliquots einer Probe in verschiedenen ELISA's getestet wurden.

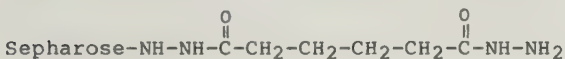
Die Intertest-Variation lag im Mittel bei 9 %. Die Intratest-Variation wurde an 8 Plasmen durch 2 - 4 Parallelmessungen gleicher Aliquots aus einer Probe innerhalb eines ELISA-Testes bestimmt. Die Intratest-Variation betrug im Mittel 7 %.

EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

1. Affinitäts-Chromatographie von Lactoferrin über verschiedene Sepharose Gele

Vorversuché hatten gezeigt, daß Lactoferrin an ATP-Sepharose bindet. Die nachfolgenden Untersuchungen sollten dazu beitragen, den Bindungstyp zu charakterisieren und insbesondere die Frage nach der Biospezifität der Bindung von LF an ATP-Sepharose zu beantworten. Aus diesem Grunde wurde zunächst eine Chromatographie mit Sepharose-Adipinsäuredihydrazid, sogenannte Spacer-Sepharose, durchgeführt.

Sepharose-Adipinsäuredihydrazid:



Wenn LF spezifisch an den Liganden des Gels bindet, so sollte mit diesem ATP-freien Affinitätsgel keine Bindung möglich sein.

1.1. Chromatographie über Spacer-Sepharose mit einem NaCl-Gradienten

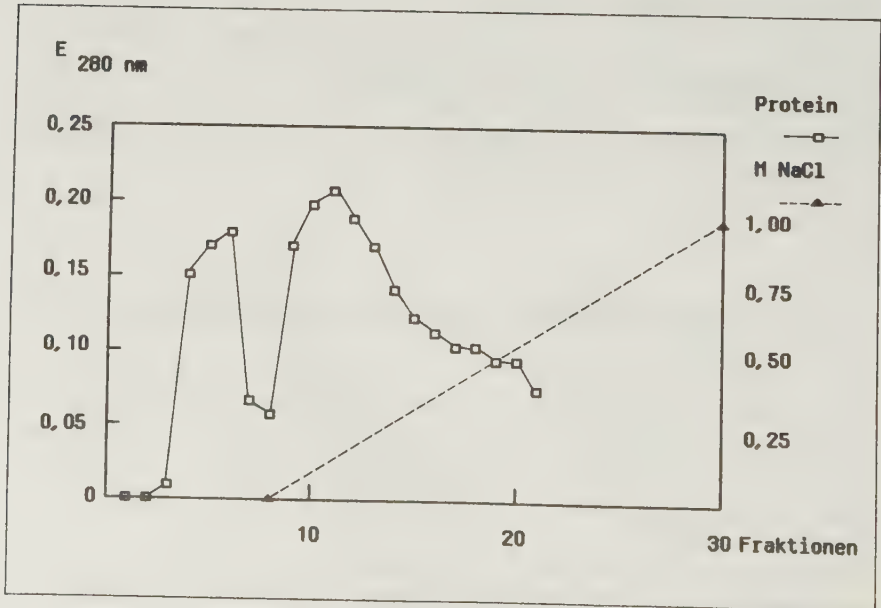
Bei dieser Chromatographie wurde im Gegensatz zu den anderen Elutionen (siehe Seite 16) mit fünffachem Gelüberschuß gearbeitet, um auch sehr geringe Bindungskapazitäten des Gels erkennen zu können.

Es wurde gereinigtes LF aus Humankolostrum (Sigma) verwendet. Zunächst wurden 2 mg des Proteins in 1 ml Puffer A gelöst und gegen Puffer A dialysiert.

Danach wurde die Proteinlösung auf 2 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und 5 Minuten bei 29000 g zentrifugiert, um nicht gelöste Bestandteile zu entfernen. Die so erhaltene Proteinlösung wurde auf die Säule: 1,77 cm² x 6 cm aufgetragen. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug bei allen Elutionsschritten 15 ml/h, das Fraktionsvolumen war 1,5 ml.

Nach dem Einlaufen der LF-Probe wurde für 30 Minuten gestoppt, danach mit einem Säulenvolumen Puffer A gespült und anschließend ein linearer NaCl-Gradient von 0 - 1,0 M NaCl mit einem Gesamtvolumen von 40 ml angeschlossen. Abbildung 2 zeigt die durchgeführte Chromatographie. Das Maximum der Ablösung von LF lag bei einer Salzkonzentration von 0,25 M NaCl.

Abb.2: Gradienten-Elutionsdiagramm nach Chromatographie über Spacer-Sepharose



1.2. Bindung von Lactoferrin an verschiedene Liganden

Die folgenden Chromatographien über verschiedene Sepharosegele wurden unter gleichen, standardisierten Bedingungen durchgeführt. Vorversuche hatten gezeigt, daß die Elutionsdiagramme für die Lactoferrine aus Seminalplasma und Humankolostrum identisch waren. Die Bindungsversuche wurden mit käuflichem LF aus Humankolostrum durchgeführt.

Die Standard-Chromatographien der folgenden Experimente wurden alle mit dem gleichen Ansatz durchgeführt: Die Proben wurden wie beschrieben (Seite 14) vorbereitet, wobei 2 mg Protein eingesetzt wurden. Die Säulendimension betrug $0,8 \text{ cm}^2 \times 6 \text{ cm}$.

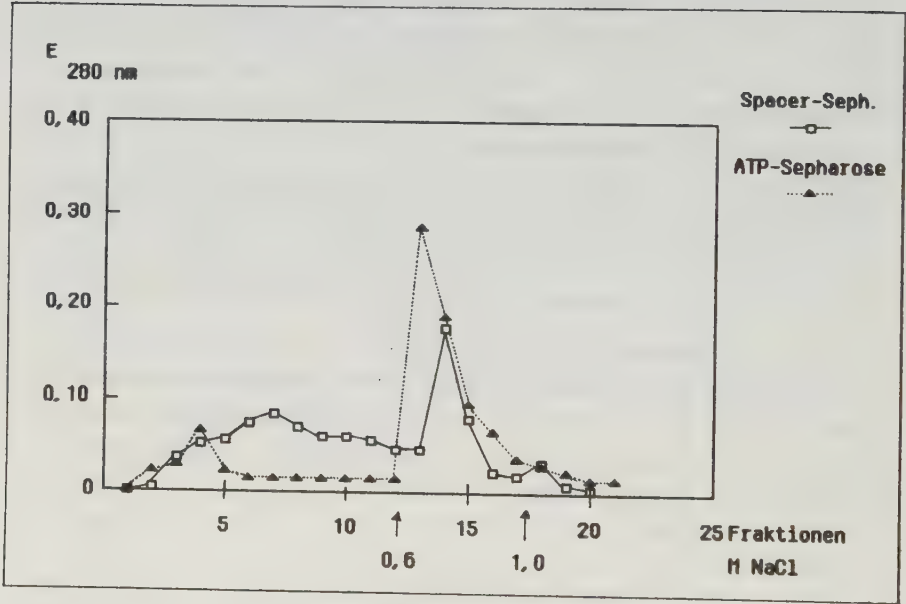
Die Durchflußgeschwindigkeit betrug bei allen Elutionsschritten 15 ml/h, das Fraktionsvolumen war 1,5 ml. Nach dem Einlaufen der Proben in das Gel wurde die Elution für 30 Minuten gestoppt. Danach wurde mit drei Säulenvolumen Puffer A gespült und mit jeweils zwei Säulenvolumen 0,6 M NaCl in Puffer A und 1 M NaCl in Puffer A gewaschen.

Bindung an Nucleotid- und Nucleosidliganden

Wie durch die Elution mit einem NaCl-Gradienten gezeigt worden war, kann die Bindung von LF an das ATP-freie Gel schon durch relativ geringe Salzkonzentrationen aufgehoben werden.

Abbildung 3 zeigt den Vergleich einer Standard- Affinitäts-Chromatographie über Spacer-Sepharose sowie über ATP- Sepharose.

Abb.3: Elutionsdiagramm nach Chromatographie über Spacer-Sephrose und ATP-Sephrose



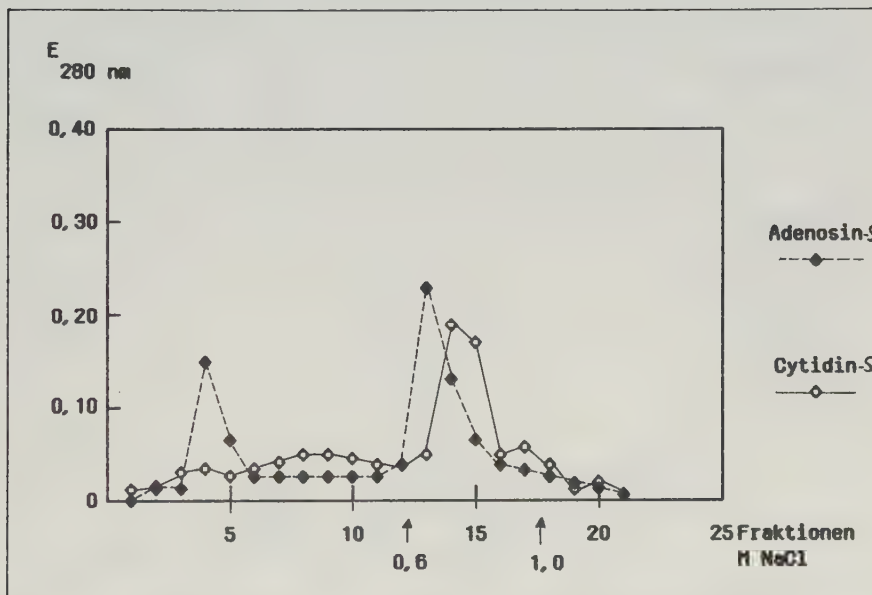
Chromatographie über	Spacer-Sephrose	ATP-Sephrose
Peak 1: Fraktion 3-11	55,7 % Protein	21,1 % Protein
Peak 2: Fraktion 12-20	44,3 % Protein	78,9 % Protein
Peak 1/2	1,25	0,27

% Protein, berechnet nach Absorption bei 280 nm

Es war bereits von Bennett (11) gezeigt worden, daß LF an Doppelstrang-DNA binden kann. Die Autoren vermuteten eine elektrostatische Bindung, die von der Zahl der negativen Ladungen der DNA abhängt. Es stellte sich nun die Frage, ob die Bindung von LF an Nucleoside und Nucleotide abhängig ist von der Anwesenheit von Purin- bzw. Pyrimidinbasen, oder vom Phosphorylierungsgrad der Nucleotide.

Affinitäts-Chromatographie über Adenosin- und Cytidin-Sepharose.

Abb.4: Elutionsdiagramm nach Chromatographie über Adenosin-Sepharose und Cytidin-Sepharose



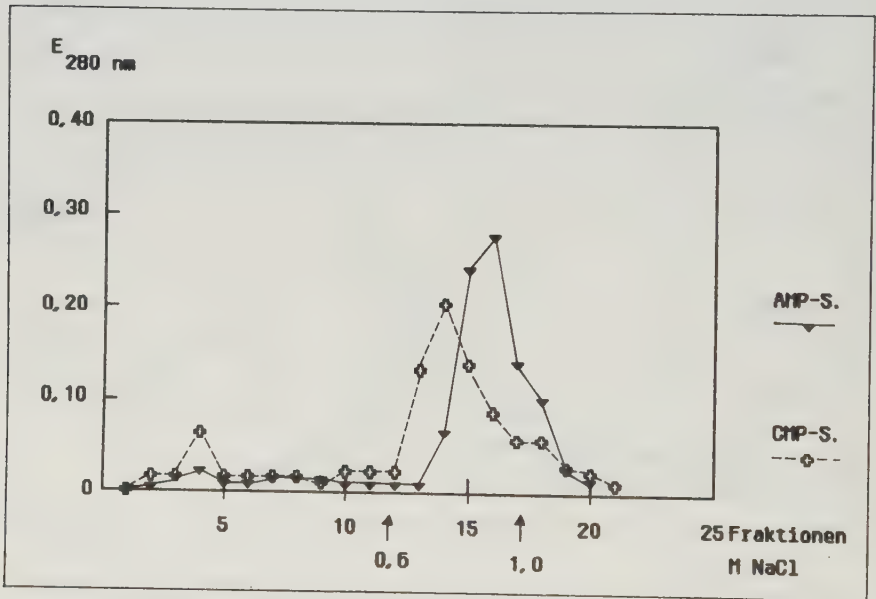
Chromatographie über	Adenosin-Sepharose	Cytidin-Sepharose
Peak 1: Fraktion 3-11	39,1 % Protein	35,8 % Protein
Peak 2: Fraktion 12-20	60,9 % Protein	64,2 % Protein
Peak 1/2	0,64	0,56

% Protein, berechnet nach Absorption bei 280 nm

Zwischen den beiden Elutionsdiagrammen bestehen keine grundlegenden Unterschiede. Das Pyrimidin-Nucleosid Cytidin-Sepharose konnte zwar geringfügig besser binden (+3 %), jedoch lässt der verbreiterte und etwas niedrigere Peak nach Waschen mit 0,6 M NaCl eher auf eine geringere Biospezifität schließen.

Affinitäts-Chromatographie über CMP-Sepharose und AMP-Sepharose

Abb.5: Elutionsdiagramm nach Chromatographie über CMP-Sepharose und AMP-Sepharose



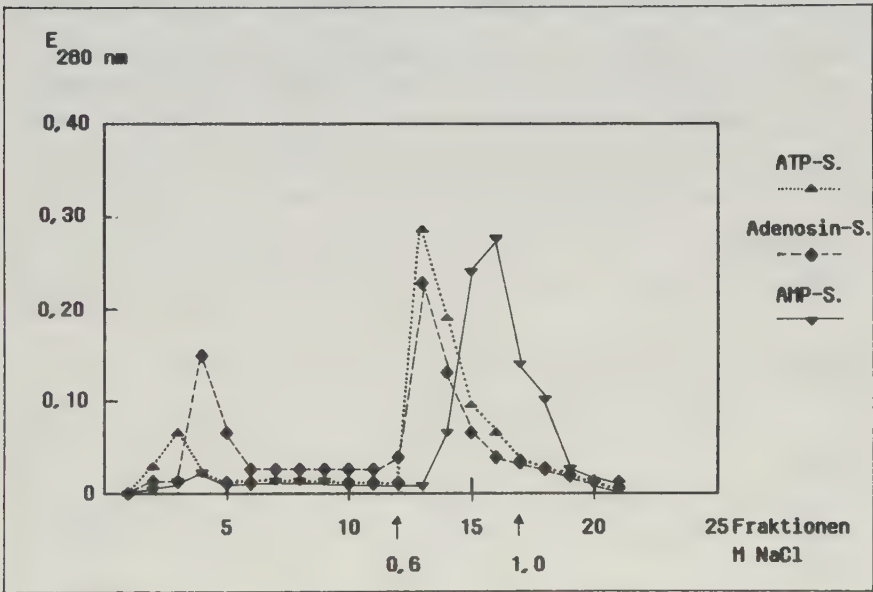
Chromatographie über	CMP-Sepharose	AMP-Sepharose
Peak 1: Fraktion 3-11	21,6 % Protein	11,9 % Protein
Peak 2: Fraktion 12-20	78,4 % Protein	88,1 % Protein
Peak1/2	0,28	0,14

% Protein, berechnet nach Absorption bei 280 nm

Bei dieser Chromatographie besaß der Purinligand deutlich höhere Bindungskapazität (+10 %). Nach dem Waschen mit 0.6 M NaCl konnte LF als größerer und schmalerer Peak eluiert werden. Dies könnte im Vergleich mit CMP-Sepharose auf eine größere Biospezifität des AMP-Liganden hinweisen.

Affinitäts-Chromatographie über Adenosin-Sepharose, AMP-Sepharose und ATP-Sepharose

Abb.6: Elutionsdiagramm nach Chromatographie über Adenosin-Sepharose, AMP-Sepharose und ATP-Sepharose



Chromatographie über Adenosin-Seph. AMP-Seph. ATP-Seph.

Peak 1	Fraktionen 1-11	39,1% Prot.	11,9% Prot.	21,1% Prot.
Peak 2	Fraktionen 12-20	60,9% Prot.	88,1% Prot.	78,9% Prot.
Peak 1/2		0,64	0,14	0,27

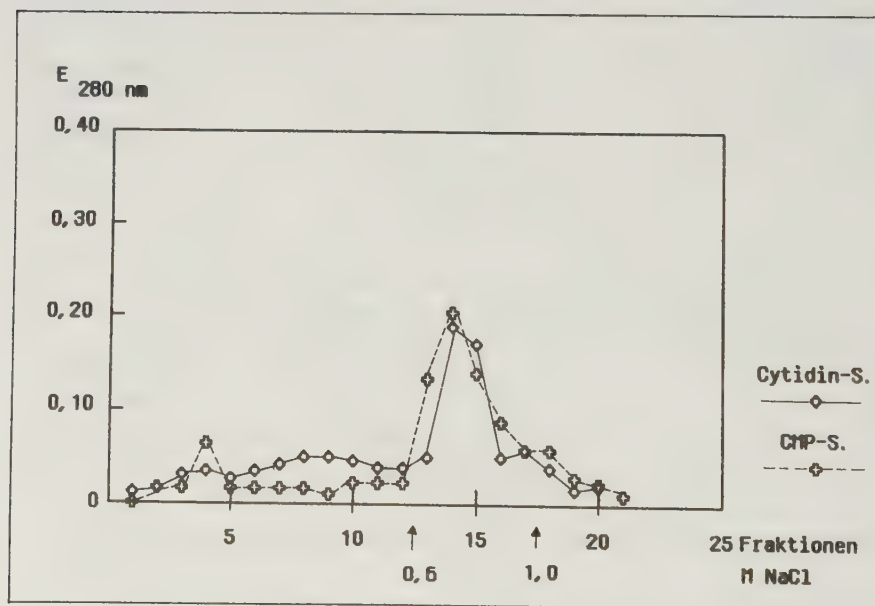
% Protein, berechnet nach Absorption bei 280 nm

Der Vergleich dieser drei Elutionsdiagramme zeigt deutlich, daß LF an phosphorylierte Nucleoside spezifischer binden konnte, als an das Nucleosid.

An den Adenosin-Liganden wurden 61 % des Proteins gebunden und an den ATP-Liganden 79 %. Die stärkste Bindung wurde mit AMP-Sepharose erzielt; hier wurden 88 % des aufgetragenen LF gebunden und durch Waschen mit 0,6 M NaCl in einem schmalen und hohen Peak abgetrennt.

Affinitäts-Chromatographie über Cytidin-Sepharose und CMP-Sepharose

Abb.7: Elutionsdiagramm nach Chromatographie über Cytidin-Sepharose und CMP-Sepharose



Chromatographie	über	Cytidin-Sepharose	CMP-Sepharose
Peak 1: Fraktion	3-11	35,8 % Protein	21,6 % Protein
Peak 2: Fraktion	12-20	64,2 % Protein	78,4 % Protein
Peak 1/2		0,56	0,28

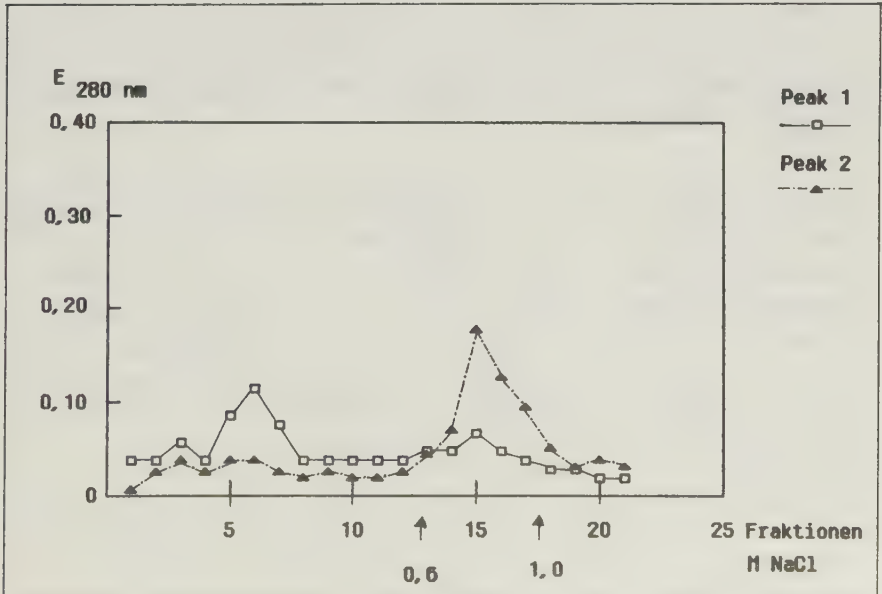
% Protein, berechnet nach Absorption bei 280 nm

Bei den Pyrimidin-Sepharosen konnte das phosphorylierte Nucleosid ebenfalls stärker binden.

1.3. Re-Chromatographie der beiden Lactoferrin-Peaks

Bei allen Affinitäts-Chromatographien mit Sepharosegelen wurde unabhängig vom Verhältnis LF zu Sepharose festgestellt, daß ein Teil von LF nicht gebunden wurde. Um mögliche Kapazitätsprobleme auszuschließen, wurden die Fraktionen 1-11 (Peak 1) und die Fraktionen 12-20 (Peak 2) der Chromatographien über ATP- und Adenosin-Sepharose vereinigt, gegen Puffer A dialysiert und rechromatographiert (Abbildung 8). Es wurde mit einem vierfachen Gelüberschuß gearbeitet.

Abb.8: Elutionsdiagramm der Re-Chromatographie über ATP-Sepharose



Das Elutionsmuster der Re-Chromatographie von Peak 2 entsprach dem der Standard-Elutionen mit ATP-Sepharose. Obwohl bereits während der ersten Chromatographie der nicht gebundene Teil des Proteins abgetrennt worden war, stellte sich LF hier wieder als Protein mit heterogenen Bindungseigenschaften dar; der gebundene Proteinanteil betrug 71 %.

Wäre das Elutionsmuster der Standard-Chromatographien durch eine zu geringe Gelbindungskapazität zustande gekommen, so hätten Peak 1 und 2 jetzt quantitativ als ein Peak eluiert werden müssen. Somit konnte die Bindungskapazität der Sepharosen nicht die Ursache für das Bindungsverhalten von LF sein.

Bei der Elution von Peak 1 wurde zwar der größte Teil des Proteins (insgesamt 62 %) wieder nicht gebunden. Ein Drittel des aufgetragenen Lactoferrins lag jedoch in bindungsfähiger Form vor. Möglicherweise existieren zwei LF-Formen, die zu einem Teil ineinander übergeführt werden können.

1.4. Chromatographie über ATP-Sepharose nach Dialyse gegen ATP, Adenosin und Uridin.

Da gereinigtes LF bei den Affinitäts-Chromatographien über Sepharosegele nie zu 100 % gebunden wurde, sollte durch Dialyse mit einem Überschuß an Nucleosiden und Nucleotiden untersucht werden, ob Bindungsstellen von LF für den Liganden blockiert waren. Wenn es möglich wäre, durch Dialyse einen Inhibitor zu verdrängen, so könnte dies anschließend zu einer verbesserten Bindung an ATP-Sepharose führen.

Lactoferrin bindet neben DNA auch RNA (44). Aus diesem Grunde wurde auch gegen Uridin dialysiert. Für die Dialysen wurden 2,0 mg LF in 1 ml Puffer A gelöst und gegen diesen Puffer dialysiert. Puffer A enthielt 0,09 mM , 0,9 mM oder 9 mM ATP; bzw. 0,09 mM Uridin oder 0,09 mM Adenosin. Dies entsprach einem 10, 100 und 1000fachen molaren Überschuß an Nucleosid/tid gegenüber der LF-Konzentration.

Um überschüssiges ATP, Adenosin oder Uridin abzutrennen, wurde anschließend nochmals gegen Puffer A dialysiert und dann über ATP-Sepharose chromatographiert. Die Abbildungen 9 und 10 zeigen die Elutionsdiagramme.

Abb.9: Elutionsdiagramm nach Chromatographie über ATP-Sepharose; LF dialysiert in Puffer A mit verschiedenen ATP-Konzentrationen.

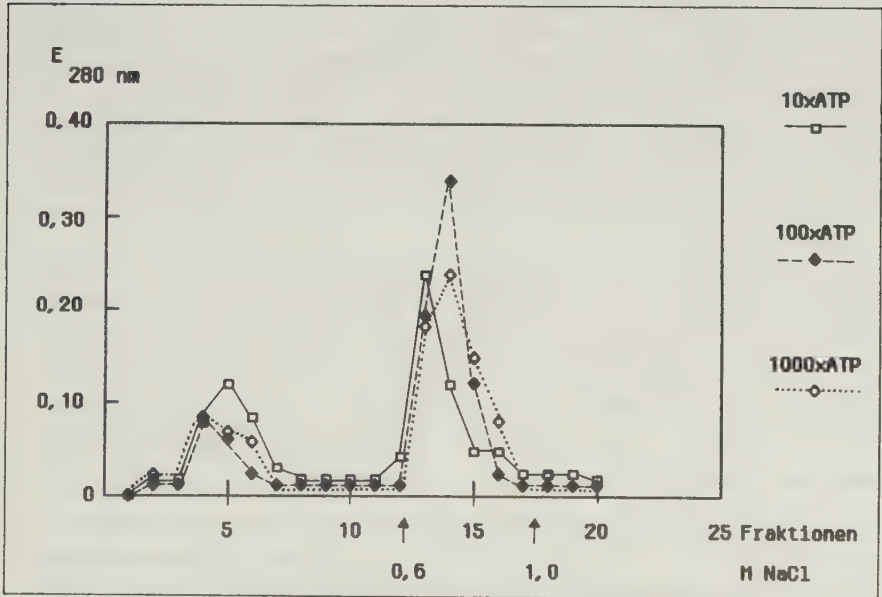
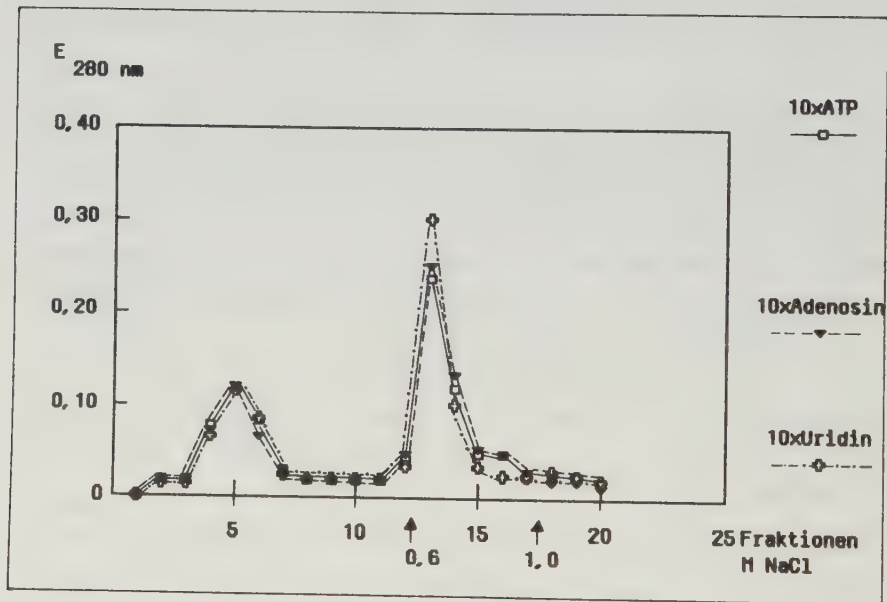


Abb.10: Elutionsdiagramm nach Chromatographie über ATP-Sepharose;
LF dialysiert in Puffer A mit Adenosin, ATP oder Uridin



Die Chromatographie über ATP-Sepharose nach Dialyse von LF mit Nucleotiden und Nucleosiden unterschied sich nicht wesentlich von der Chromatographie mit unbehandeltem LF. Nach der Dialyse mit verschiedenen ATP-Konzentrationen konnte zwar insgesamt eine leicht verminderte Bindung beobachtet werden, jedoch keine eindeutige Zu- oder Abnahme der Bindung, die mit den verschiedenen ATP-Konzentrationen korrelierte. Peak 2 enthielt bei Chromatographie über ATP-Sepharose ohne Dialyse 78,9 % der aufgetragenen LF-Menge. Nach Dialyse gegen ATP enthielt Peak 2 67,2 % des aufgetragenen Proteins.

2. Einflüsse unterschiedlicher Eisen-Konzentrationen auf die Affinitäts-Chromatographie von Lactoferrin über ATP-Sepharose und auf den ELISA-Test

Wie auch die Transferrine, besitzt LF zwei Metallbindungsstellen. Unter gleichzeitiger Freisetzung von Protonen können zwei Fe(III)-Ionen synergistisch mit zwei Hydrogencarbonat-Anionen gebunden werden (1). Die hohe Affinität von LF für Fe(III), $K_1 = 2,6 \times 10^5$ M bei pH 6,35-6,70 und die Stabilität des LF-Eisen-Komplexes auch bei pH-Werten kleiner als 4,0, waren bereits Gegenstand vielfacher Untersuchungen und Interpretationen bezüglich der Rolle von LF bei der Abwehr bakterieller Infektionen (1).

Mit den folgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob die Fe(III)-Konzentration die Chromatographie über ATP-Sepharose und den spezifischen Nachweis mit dem ELISA-Test beeinflusst. Um Unterschiede der Bindung an ATP-Sepharose zu erkennen, wurde im Vergleich mit einer Standard-Affinitäts-Chromatographie eine ebensolche mit 200fach höherer Fe(III)-Konzentration durchgeführt. Hierfür wurden 4 ml gepooltes Humanseminalplasma 10 Minuten bei 19000 g abzentrifugiert und der Überstand in zwei Aliquots aufgeteilt, die 1,2 mg/ml LF (15,3 μ M) enthielten.

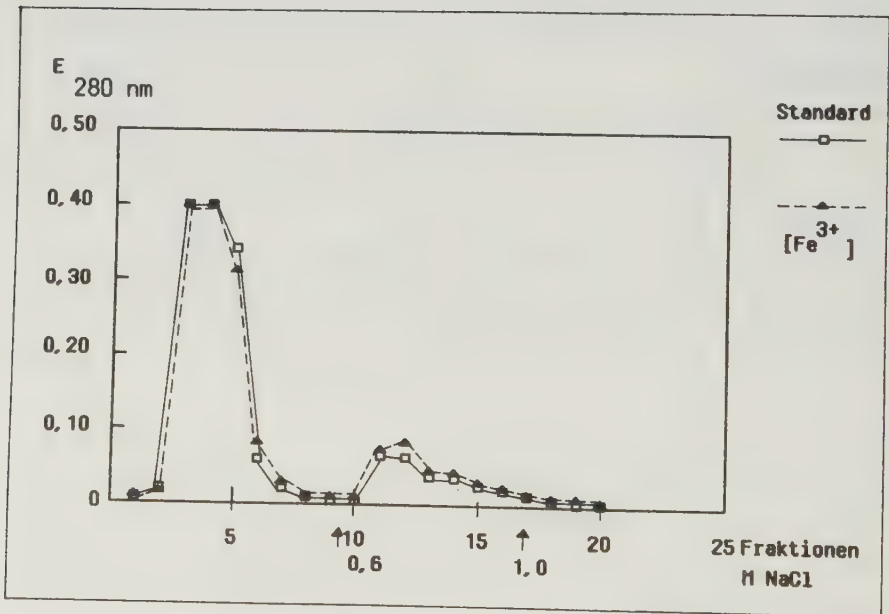
Das Aliquot für den Standardansatz wurde gegen Puffer A dialysiert. Die Probe für den Ansatz mit Eisenüberschuß wurde mit FeCl₃ in einer Endkonzentration von 3,0 mM versetzt und gegen Puffer A dialysiert, der ebenfalls 3,0 mM FeCl₃ enthielt. Dies entsprach bei einer 15,3 μ M LF-Lösung einem 200fachen molaren Überschuß an Fe(III).

Nach Dialyse wurden die Proben mit dem jeweiligen Dialysepuffer auf 3 ml aufgefüllt. Überschüssiges FeCl₃ wurde durch 30 minütiges Inkubieren mit 4,5 mM MgCO₃ in Puffer A bei Raumtemperatur gebunden (28) und das entstandene Präzipitat 10 Minuten bei 3000 g abzentrifugiert.

Abbildung 11 zeigt die Chromatographie der beiden LF-Lösungen, welche nach den auf Seite 12 beschriebenen Standardbedingungen durchgeführt wurde. Der Elutionspuffer (Puffer A) enthielt bei dem Ansatz mit Fe(III)-Überschuß 3,0 mM FeCl₃.

Die Eisenbestimmung wurde mittels Atom-Absorptions-Spektrometrie durchgeführt. Die untere Nachweisgrenze liegt mit dieser Methode bei 5 µM Eisen.

Abb.11: Vergleich einer Standardelution über ATP-Sepharose mit einer Elution bei 200fach höherer Fe(III)-Konzentration.



	Standard	Fe(III)-Überschuß
Peak 1: Frakt. 1-10	86 % Protein	83 % Protein
Peak 2: Frakt. 11-20	14 % Protein	17 % Protein

% Protein, berechnet nach Absorption bei 280 nm

Die Auswertungen ergaben, daß die Standard-Affinitäts-Chromatographie bereits bei einem Überschuß an Fe(III) durchgeführt wurde. Noch höhere Eisenkonzentrationen änderten das Elutionsmuster erwartungsgemäß nicht.

Die ELISA-Tests wurden bei unterschiedlichen LF/Eisen Quotienten durchgeführt:

Tabelle 1: Molarer Eisen-Überschuß im Elisa-Test

LF nach Affinitäts-Chromatographie	40,0	fach
Blutplasma	4000,0	fach
Seminalplasma (X=10)	3,4	fach
Prostataadenome	64,0	fach
LF (Sigma)	1,4	fach

Das Verhältnis von LF zu Eisen variierte bei den ELISA-Tests, wobei die tatsächliche Eisensättigung von LF nicht bekannt war.

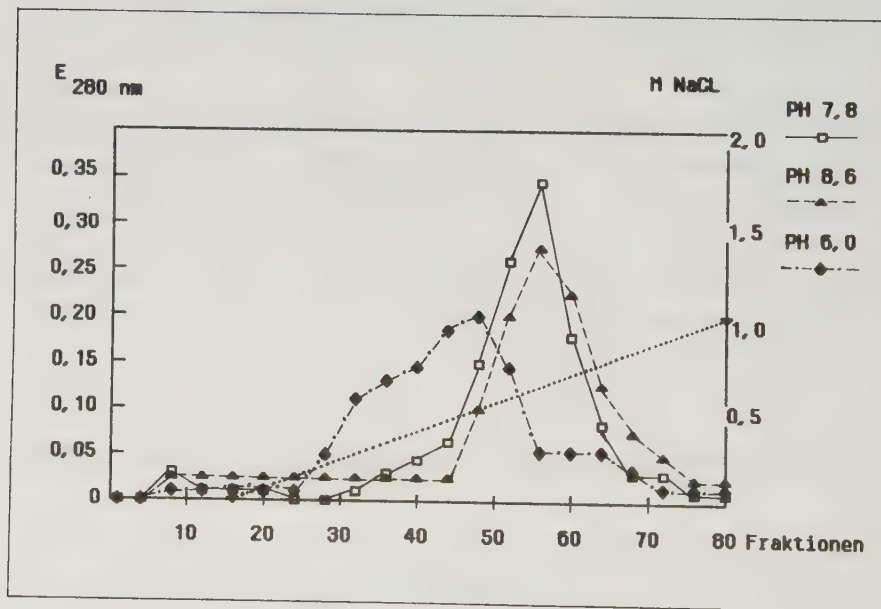
3. pH-Abhängigkeit der Bindung von Lactoferrin an ATP-Sepharose

Für diese Versuche wurde LF aus Humanseminalplasma verwendet. Das Seminalplasma war von einem anderen Arbeitskreis, zur Isolierung des Trypsininhibitors, über eine Trypsin-Säule chromatographiert worden.

Das so vorbehandelte Seminalplasma wurde bei den pH-Werten 6,0; 7,8 und 8,6 über ATP-Sepharose chromatographiert. Hierfür wurden je 4,5 mg LF abzentrifugiert, in Tris Puffer, der auf die jeweiligen pH-Werte eingestellt war, gelöst und gegen den jeweiligen Puffer dialysiert.

Die Chromatographie erfolgte ebenfalls mit diesen Puffern. Nach dem Beladen und Waschen der Säulen wurde LF mit 400 ml eines linearen NaCl Gradienten von 0 - 1 M NaCl eluiert. Alle anderen Versuchsbedingungen entsprachen den auf Seite 12 für die Standardisolierung beschriebenen. Das Elutionsdiagramm zeigt Abbildung 12.

Abb.12: pH -Abhängigkeit der Bindung an ATP-Sepharose



Die verschiedenen pH-Werte hatten einen deutlichen Einfluß auf die Chromatographie von LF. Bei pH 6,0 wurde das Protein schon bei einer Salzkonzentration von 0,1 - 0,2 M NaCl abgelöst, das Maximum lag bei 0,5 M NaCl. Dagegen wurde LF bei pH 7,8 und 8,6 erst ab 0,4-0,5 M NaCl abgelöst. Das Maximum der Ablösung lag bei diesen beiden pH-Werten bei 0,65 M NaCl.

Dies läßt eine spezifische Bindung vermuten, da LF mit einem Isoelektrischen Punkt von 6,9 (11) unter diesen Bedingungen selbst eine negative Nettoladung besitzen sollte und damit eine elektrostatische Bindung unwahrscheinlich ist.

Die weiteren Chromatographien über ATP-Sepharose wurden bei pH 7,8 durchgeführt, da der Peak hier am schmalsten und größten war.

4. Affinitäts-chromatographische Isolierung von Lactoferrin aus Human-Seminalplasma

Proben

Es wurden 5-6 ml des tiefgefrorenen Seminalplasmas über einen Zeitraum von 1 Stunde bei 4° C aufgetaut, anschließend 20 Minuten bei 29000 g zentrifugiert und danach der Überstand gegen Puffer A dialysiert. Bei allen Arbeitsschritten wurden jeweils 100 μ l Aliquots zur Bestimmung von Protein und LF entnommen. Das Sediment enthielt nur geringe Mengen LF (< 0,2% des gesamten LF) und wurde verworfen. Das Volumen des Überstandes betrug 5 ml und änderte sich während der Dialyse nicht. Nach Dialyse wurden ausgefällte Proteine 10 Minuten bei 29000 g abzentrifugiert.

In diesem Niederschlag konnten nur Spuren von LF nachgewiesen werden. Der Gesamtverlust von LF durch Zentrifugation und Dialyse betrug 4,2 %, bei einer gleichzeitigen LF-Anreicherung um das dreifache.

In einem Vorversuch sollte durch Ammoniumsulfat-Fällung versucht werden, eine selektive Proteinanreicherung zu erzielen. Hierfür wurde der Überstand des zentrifugierten Seminalplasmas tropfenweise mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung in Puffer A unter Rühren versetzt, bis eine Endkonzentration von 45,5 % Ammoniumsulfat-Sättigung erreicht war.

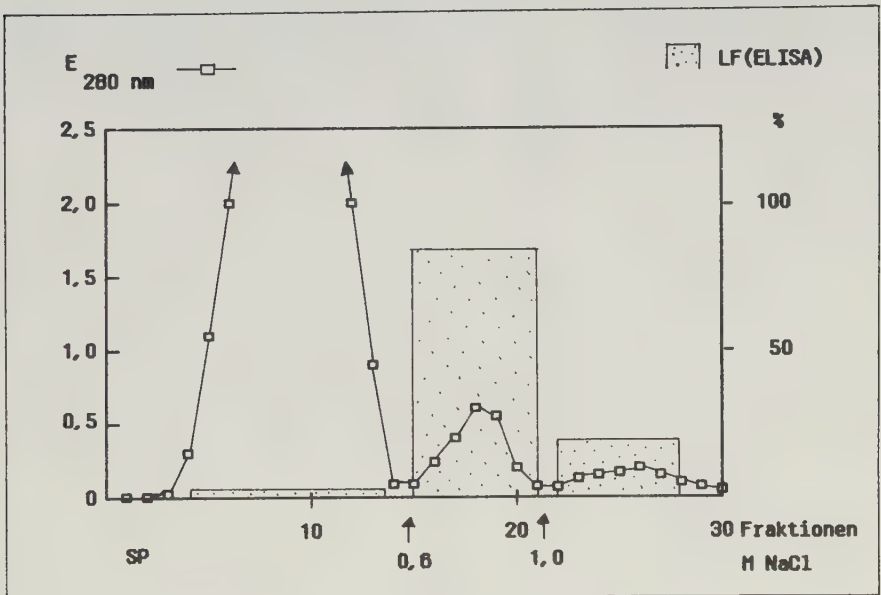
Bei 50 % Sättigung soll LF nicht präzipitiert werden (11), weshalb LF im vorliegenden Ansatz in Lösung verbleiben sollte. Die Proben wurden 10 Minuten bei 42000 g zentrifugiert und aus Überstand und Sediment Protein und LF bestimmt. Es konnte jedoch keine selektive Proteinfällung erreicht werden, und zudem wurden nur noch 75,7 % des gesamten LF nachgewiesen. Bei den weiteren Chromatographien wurde deshalb auf eine vorhergehende Salzfällung verzichtet.

Affinitäts-Chromatographie

Für die Affinitäts-Chromatographie wurde das Gel ATP-Sepharose verwendet. Da die Bindungskapazität des Gels für LF nicht bekannt war, wurde in Vorversuchen die benötigte Gelmenge bestimmt und bei den vorliegenden Chromatographien ein Bindungsverhältnis von 1 ml ATP-Sepharose pro 1 mg gereinigtes LF zugrunde gelegt. Um optimale Bindungsbedingungen zu erreichen, wurde wie bei der Affinitäts-Chromatographie von Phosphoglyceratkinase aus Mäuseskelettmuskel (49) mit einem Sicherheitsfaktor von mindestens 1,5 gearbeitet. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4° C durchgeführt. Das LF aus Human-Seminalplasma wurde nach dem auf Seite 12 beschriebenen Standardansatz eluiert. Die Säulendimension betrug hier 1,77 cm² x 6 cm. Nach dem Auftragen der Proben wurde mit 3 Säulenvolumen Puffer A gespült, um unspezifisch gebundene Proteine auszuwaschen. Durch schrittweises Erhöhen der Ionenstärke mit jeweils 2 Säulenvolumen 0,6 M NaCl und 1,0 M NaCl in Puffer A wurde LF eluiert. Die Säulen wurden mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 30 ml äquilibriert, beladen, gewaschen und eluiert. Das Fraktionsvolumen war 3 ml. Die Proteinbindung wurde während des Auftragens durch Absorptionsmessung bei 280 nm im Eluat kontrolliert. Die Bindung von LF wurde mit dem ELISA-Test bestimmt. Auf eine spezifische Elution mit ATP mußte verzichtet werden, da die Säule bei 280 nm dann nicht mehr auszutesten gewesen wäre und ein anderer direkter LF-Sofortnachweis fehlte.

Das Eluat wurde fraktionsweise bei 280 nm getestet. Fraktionen mit mehr als 0,07 mg/ml Protein wurden vereinigt und aus diesem Pool Protein und LF bestimmt. Die Elution ist in Abbildung 13 dargestellt. Tabelle 2 zeigt eine Zusammenstellung der Isolierungen aus Seminalplasma.

Abb.13: Affinitäts-Chromatographie von Seminalplasma über ATP-Sepharose



Reinheitskontrolle

Die Reinheit des chromatographierten LF wurde mittels SDS-PAGE getestet. Der Hauptanteil des mit 0,6 M und 1,0 M NaCl ausgewaschenen Proteins entsprach der Bande von gereinigtem, käuflichen LF aus Humankolostrum. Ein geringer Anteil an Fremdproteinen (fünf schwache Proteinbanden mit kleinerem Molekulargewicht als LF) war noch vorhanden. Diese Verunreinigungen könnten in einem zweiten Präparationsschritt mittels Molekularsiebchromatographie abgetrennt werden.

Das vorgereinigte LF wurde mittels Ammoniumsulfat-Dialyse ausgefällt und in gefälltem Zustand aufbewahrt.

Tab.2: Übersicht über die Affinitäts-Chromatographie von Seminalplasma

Isolierungsschritt	n	Protein [mg] $\bar{x}$ SD	Protein %	LF [mg] $\bar{x}$ SD	LF/Protein % $\bar{x}$ SD	Ausbeute Einzelsschritt* $\bar{x}$ SD	LF & Gesamt** $\bar{x}$ SD	LF - ANREICHERUNG Einzelsschritt* Gesamt** $\bar{x}$ SD
1. Ausgangsmaterial 5 ml Seminalplasma	4	226,8 4,9	100,0	4,90 1,60	2,2 0,7	-	-	-
2. Nach Zentrifuga- tion und Dialyse: Überstand: Sediment :	4 4	68,4 10,4 156,3 8,1	30,2 68,9	4,70 0,90 0,01 0,01	6,8 0,5 0,0 -	96,0 10,4 0,2 0,2	-	3,1 0,6 - -
3. Nach ATP Sepharose Pool 1: Auftragen Pool 2: Waschen Pool 3: 0,6 M NaCl Pool 4: 1,0 M NaCl Pool 5: SDS-Harnst.	3 3 3 3 1	48,2 15,2 3,1 1,2 7,3 2,5 3,2 0,6 12,8 -	21,3 1,4 3,2 1,4 5,6	0,03 0,02 0,01 0,00 1,22 0,07 0,26 0,13 - -	0,1 0,1 0,3 0,2 16,8 5,4 8,1 5,7 - -	0,6 0,1 0,2 0,0 26,2 5,2 5,5 3,7 - -	0,6 0,1 0,2 0,1 25,1 1,9 5,3 3,6 - -	- - - - 2,5 1,2 1,2 1,5 - -
						32,5 3,4	31,2 7,5	

* Einzelschritt 100 % LF vor dem jeweiligen Schritt, der in der Zeile dargestellt ist.

** Gesamt 100 % LF im Seminalplasma.

Erläuterungen zur Chromatographie über ATP-Sepharose

Bei der Chromatographie von Seminalplasma über ATP-Sepharose wurden in Pool 1 21 % des Gesamtproteins, bzw 70 % des auf die Säule aufgetragenen Proteins, eluiert. Diese Proteine besaßen entweder keine spezifische Affinität für das Gel, oder ihre Basizität war für eine Bindung an den negativen Liganden von ATP-Sepharose zu gering.

In den NaCl-Eluaten Pool 3 und 4 wurden zusammen 4,6 % des Gesamtproteins, beziehungsweise 17 % des aufgetragenen Proteins, eluiert, wobei in diesen Fraktionen 32 % des aufgetragenen LF im ELISA-Test nachgewiesen werden konnten. In allen anderen Fraktionen wurde kein nennenswerter LF-Anteil gefunden, sodaß die Gesamtausbeute von LF 32,5 % betrug.

Es stellt sich die Frage, ob das restliche LF nicht eluiert wurde, oder ob es während der Elution so verändert worden war, daß es im ELISA-Test nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Auch bei den Chromatographien von gereinigtem LF aus Humankolostrum über verschiedene Sepharosegele (siehe Seite 16) konnten Protein und LF nicht in gleichem Verhältnis im Eluat nachgewiesen werden. Die Messung der Absorption bei 280 nm ergab insgesamt immer nahezu 100 % des Proteins im Eluat. Dies zeigt, daß LF nicht als immobilisiertes Protein auf der Säule verblieb; jedoch wurden auch hier in Stichproben nie mehr als ca. 30 % des aufgetragenen LF im ELISA-Test gemessen. Aus diesem Grunde erfolgte die Auswertung dieser Versuche über die Extinktion.

Die SDS-PAGE der Eluate von Pool 3 und 4 aus der Chromatographie von Seminalplasma wies ebenfalls darauf hin, daß mehr LF im Eluat war, als durch den ELISA-Test nachgewiesen werden konnte. In Pool 3 betrug der LF-Anteil am Gesamtprotein 16,8 % und in Pool 4 nur 8,1 %. Dagegen fanden sich in der Elektrophorese neben der starken Hauptbande, welche gereinigtem LF aus Humankolostrum entsprach, nur noch schwache Fremdproteinbanden.

5. Spaltung von DNA und RNA durch Lactoferrin in Gegenwart von H_2O_2

Es wurde untersucht, ob LF in Anwesenheit von H_2O_2 als Oxidans DNA oder RNA spalten kann.

Das mit Ammoniumsulfat gefällte, vorgereinigte LF aus Seminalplasma, wurde 5 Minuten bei 29000 g abzentrifugiert und in Puffer A gelöst. Die RNase Aktivität wurde mit einem von Kunitz (38) entwickelten Testansatz gemessen.

Die Testkonzentrationen waren: 6 μM LF bzw. RNase; 0.5 mg/ml tRNA in 50 μM NaAcetat-Puffer pH 5,0; 25 μM H_2O_2

Die gemessenen Aktivitäten waren:

RNase	:	40,00 U/mg
LF+ H_2O_2	<	0,08 U/mg
LF	<<	0,04 U/mg

Die LF Aktivität war mit H_2O_2 500fach schwächer als die RNase Aktivität, ohne H_2O_2 lag sie unterhalb der Nachweisgrenze. Nach diesem Ergebnis besitzt LF keine spezifische RNase-Aktivität.

6. Lactoferrin als Markerprotein urologischer Erkrankungen

Der Anlaß für die nachfolgenden Untersuchungen war eine Beobachtung, die bei der Entwicklung des ELISA-Testes für LF gemacht worden war. Von fünfzig untersuchten Plasmaproben zeigten einige deutlich erhöhte LF-Werte und es stellte sich heraus, daß ein Teil dieser Proben mit hohen LF-Plasmakonzentrationen von Patienten mit klinisch diagnostiziertem Prostatakarzinom stammte.

Das Prostatakarzinom ist vor allem ein Malignom des Präseniums und Seniums. Etwa 25 % aller Männer über 70 Jahren haben ein "Incidental Karzinom", das klinisch stumm ist und jederzeit ohne bekannte Auslöser in malignes Wachstum übergehen kann. In der Krebsmortalität des Mannes steht das Prostatakarzinom heute an dritter Stelle nach den Malignomen der Lunge und des Gastrointestinaltraktes.

Für Therapie und Prognose ist die Frühdiagnose entscheidend, aber sie ist hier besonders schwierig. Das Prostatakarzinom kann sehr früh metastasieren und ist in der Initialphase klinisch unauffällig. Es entsteht zu 80 % im dorsalen, harnröhrenfernen Bereich der Prostata und verursacht deshalb im Frühstadium noch keine Krankheitssymptome wie zum Beispiel Miktionsbeschwerden.

Als Präventivmaßnahme wird heute die jährliche rektale Untersuchung aller Männer über 45 Jahre empfohlen. Klinische Marker, wie alkalische und saure Phosphatase, sind im Initialstadium nicht aussagekräftig und über neuere biochemische Marker wurde zwar in der Literatur berichtet (siehe Diskussion), sie fanden aber noch keine routinemäßige klinische Anwendung.

Es stellte sich nun die Frage, ob der beobachtete Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Prostatakarzinoms und Veränderungen des Plasma LF-Spiegels bestätigt werden konnte, und vor allem,

in wieweit diese Veränderungen bereits in den frühen Tumorstadien To und T1 erkennbar sind. Zu diesem Zweck wurde LF aus Plasma, Prostatagewebe und Zellkultur bestimmt.

6.1. LF im Plasma

Von 28 Patienten mit gesicherter klinischer Diagnose von benignen und malignen Veränderungen der Prostata oder anderen urologischen Erkrankungen wurde LF im Plasma bestimmt.

Die Kontrollgruppe bildeten Plasmaproben von 14 gesunden und fertilen Männern im Alter von 20 - 60 Jahren.

Citratblut wurde 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert und das Plasma in 0,1 ml Aliquots bei -24 °C eingefroren. Für die LF-Bestimmung wurden die Proben bei 4 °C aufgetaut, mit fünffachem Volumen Puffer D versetzt, 5 Minuten geschüttelt und danach getestet.

Tabelle 3 zeigt die erhaltenen Daten.

Tabelle 3: LF aus Blutplasma

Diagnose	Nr.	LF Plasma [µg/ml]	Nr.	$\bar{X}$ LF Plasma [µg/ml]	SD
Gesunde Männer			1 - 14	0,414	0,094
Prostata Adenome					
-	1	1,357	1 - 5	1,252	0,209
-	2	1,166			
-	3	1,076			
-	4	1,093			
-	5	1,570			
sehr kleines A.	6	0,213	6 - 8	0,318	0,111
kleines A.	7	0,434			
-	8	0,308			
			1 - 8	0,902	0,512
Prostata Karzinome					
T ₁ N _x M ₀ hochdiff.	1	0,221	1 - 4	0,445	0,215
"	2	0,528			
"	3	0,670			
" niedr.diff.	4	0,305			
T ₂ N _x M ₀	5	0,438	5 - 7	0,514	0,332
"	6	0,227			
T ₂₋₃ N _x M ₀	7	0,877			
T ₃ N _x M ₀	8	0,309	8 - 10	0,524	0,460
T ₃ N _x M ₀	9	1,053			
T ₃₋₄ N _x M ₀	10	0,212			
			1 - 10	0,489	0,297
Sonstige Erkrankungen					
Epididymitis	11	0,730	12		
Prostatitis	12	2,018			
Nierensteine	13	0,370	13 - 14	0,556	0,263
"	14	0,742			
Harnröhrenenge	15	0,683	15 - 17	0,697	0,328
"	16	1,032			
"	17	0,377			
Osteomyelitis	18	6,149			
Polyurie	19	1,481			

Die mittlere LF-Konzentration im Plasma von 14 **gesunden und fertilen Männern** stimmte mit anderen in der Literatur beschriebenen Ergebnissen überein (siehe Tabelle 10, Seite 60).

Bei acht Patienten mit **Prostataadenomen** war die mittlere LF-Konzentration zweifach erhöht. Die Einzelwerte wiesen eine großen Variationsbreite auf. Unterteilt man die Proben, so ergaben sich für drei Plasmen Konzentrationen im Bereich des Normalwertes; wobei für zwei der Proben die Angabe "kleines, bzw. sehr kleines" Adenom vorlag. Für die übrigen Adenome lagen keine Größenangaben vor.

Die Konzentrationen im Plasma von 10 Patienten mit **Prostatakarzinomen** lagen innerhalb des Standardbereichs der Normalwerte für gesunde Männer. Wegen der diagnostischen Bedeutung möglicher LF-Konzentrationsänderungen in den frühen Tumorstadien wurden die Plasmaproben in Tabelle 3 nach dem TNM- System geordnet.

Für die klinische Beurteilung des Prostatakarzinoms werden entsprechend der Empfehlung der "Union Internationale contre le cancer" fünf Stadien unterschieden:

To = Zufallsbefund; nicht palpabel (inzidentielles Karzinom)

T1 = palpabler, isolierter kleiner Knoten

T2 = palpable, karzinomatöse Infiltration der Prostata; die Kapsel ist nicht mehr intakt, der Tumor ist aber auf die Prostata beschränkt; (d.h. keine Überschreitung der Organgrenze)

T3 = palpable, karzinomatöse Infiltration über die Organgrenze hinaus.

T4 = Karzinom fixiert Prostata mit der Umgebung.

Von T₁ bis T_{3/4} ließ sich ein geringer Anstieg der mittleren LF-Konzentration feststellen. Die Mehrzahl der Proben lag jedoch im Bereich der Standardabweichung der Normalwerte.

Insgesamt zeigte sich keine so deutliche Tendenz für eine Erhöhung der LF-Konzentrationen, wie bei den Plasmaproben von Patienten mit Prostataadenomen; und vor allem im Stadium T₁ war die LF-Konzentration normal.

Bei den Proben 9 und 10, welche T₃ und T₃₋₄ repräsentierten, waren die alkalischen Phosphatasen erhöht, in allen anderen Fällen lagen die Phosphatasen im Normbereich.

Die Plasmawerte von Patienten mit **"sonstigen Erkrankungen"** entsprachen der schon beschriebenen Tendenz eines LF-Anstiegs bei entzündlichen Erkrankungen (siehe Diskussion, Seite 61).

LF war hoch in je einem Fall mit Epididymitis, Prostatitis und Osteomyelitis. Plasmen von Patienten mit Nierensteinen und Harnröhrenstenosen zeigten ebenfalls erhöhte Werte, was auf eine häufig auftretende Begleitentzündung der ableitenden Harnwege zurückzuführen sein könnte.

6.2. LF in Prostatagewebe

Es wurde nur Gewebe mit histologisch gesicherter Diagnose verarbeitet.

Normales Prostatagewebe stammte aus Autopsien von Patienten die nicht länger als 24 h verstorben waren. Die Gewebeproben wurden behandelt wie Adenomgewebe.

Prostataadenome waren Operationspräparate, die durch Adenomektomie erhalten worden waren. Sie wurden postoperativ sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verarbeitung bei -24 °C tiefgeköhlt.

Für die LF-Bestimmung wurden die Proben mit einem Gewicht von $X = 229 \text{ mg} \pm 85$ angetaut, mechanisch zerkleinert und 5 Minuten mit einem Mikropotter homogenisiert. Danach wurden sie mit dreifachem Volumen Puffer D versetzt, 30 Minuten geschüttelt und 15 Minuten bei 29000 g zentrifugiert. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Drei Gewebeproben wurden vor dem Zentrifugieren für 2 Sekunden mit einem Branson Sonifier auf Stufe 2, kleine Nadel, ultrabeschallt und danach 5 Minuten geschüttelt. Die LF-Konzentration veränderte sich durch diese Prozedur jedoch im Vergleich mit unbeschalltem Gewebe nicht.

Gewebe aus Prostatakarzinomen wurde durch Feinnadelbiopsie entnommen. Diese Proben wurden sofort getestet, da wegen der kleinen Probenvolumina (10-50 µl) nur eine geringe LF-Menge zu erwarten war und mögliche Verluste durch Einfrieren verhindert werden sollten. Die Proben wurden mit 200 µl Puffer D versetzt, 20 Minuten bei 4 °C geschüttelt und danach 10 Minuten bei 29000 g zentrifugiert. Ultrabeschallte Proben zeigten auch hier keine Konzentrationsunterschiede.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4: LF aus Prostatagewebe

Probe	LF (µg/g Gewebe)		LF (µg/mg Protein)	
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD
Normales Gewebe				
1	37,0		1,4	
2	68,7		2,3	
1 - 2	52,9	22,4	1,9	0,6
Adenome:				
1	187,7		7,2	
2	118,0		5,5	
3	140,6		6,3	
4	66,3		1,6	
5	207,1		7,3	
6	147,8		5,0	
7	173,6		8,8	
8	214,0		7,4	
9	237,6		9,2	
10	58,5		1,1	
11	69,4		1,4	
12	91,5		1,5	
13	47,0		1,5	
14	52,9		1,5	
15	121,6		3,6	
16	64,6		2,0	
17	80,0		2,1	
18	480,0		18,5	
19	386,0		15,4	
20	414,3		13,7	
1 - 20	167,9	126,6	6,0	5,1
1 - 17	122,2	62,9	4,3	2,9
Karzinome				
1	38,6		-	
2	22,9		0,77	
3	33,8		0,85	
4*	34,5		1,10	-
5	30,9		0,75	-
1 - 5	32,1	5,85	0,86	0,16

4* = Mittelwert aus 2 Biopsien eines Karzinoms

mitteldiff.
mitteldiff.
hochdiff.

Die LF-Konzentrationen für normales Prostatagewebe sind wahrscheinlich nicht repräsentativ. Aufgrund der Schwierigkeiten, Autopsien von gesunden Geweben zu erhalten, lagen nur zwei Proben vor; zudem ist Autopsiematerial wegen der stark proteolytischen Aktivität des Prostatagewebes nicht besonders aussagekräftig (59). Diese Daten wurden deshalb bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

Die LF-Werte in Adenom- und Karzinomgeweben unterschieden sich deutlich voneinander, wobei Adenome bezogen auf Gewebe und Protein eine etwa fünffach höhere Konzentration aufwiesen.

Zunächst wurde vermutet, daß diese Unterschiede zumindest zum Teil auf die verschiedene Behandlung der Proben zurückzuführen waren. Sämtliche Adenome waren vor der Bestimmung von LF eingefroren, die Biopsien wurden anfangs zunächst ohne Einfrieren getestet. Es zeigte sich jedoch, daß die weiteren LF-Bestimmungen aus Parallelproben eingefrorenem Biopsiematerials Konzentrationen ergaben, die sich nicht wesentlich von denen aus Frischgewebe unterschieden.

Für die Biopsien lagen keine Angaben über TNM - Stadien vor.

6.3. Statistische Auswertung der Daten

Die LF-Konzentrationen von Patienten mit Prostataadenomen- und Karzinomen wurden mittels eines t-Tests, der mit einem SPSS-Programm ausgeführt wurde, miteinander verglichen.

Dieses Programm (51) macht zunächst einen f-Test um das Vorliegen unterschiedlicher Varianzen zu überprüfen. Sind diese signifikant verschieden, so wird der t-Test für "separate variance estimate" verwendet. Sind die Varianzen nicht signifikant verschieden, so wird der t-Test für "pooled variance estimate" angewendet.

Die Nullhypothese für diesen Test war $u_1 = u_2$ und die alternative Hypothese $u_1 \neq u_2$. Entsprechend diesen Ausgangshypothesen wurde der zweiseitige Student's t-Test durchgeführt.

Unterschiede wurden als signifikant (S) akzeptiert bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $P \leq 0,05$ und als hoch signifikant (HS) bei $p \leq 0,01$. Die Tabellen 5 und 6 zeigen die Ergebnisse der t-Tests.

Tabelle 5: t-Test der LF-Konzentration im Plasma

Gruppe*	n	$\bar{X}$ µg/ml	SD	t-Wert	P	Signifikanzniveau
Gesunde	14	0,414	0,094	-2,67	0,032	S
Adenome	8	0,902	0,512			
Gesunde	14	0,414	0,094	-8,64	0,000	HS
Ade. 1-5	5	1,252	0,210			
Gesunde	14	0,414	0,094	1,56	0,141	NS
Ade. 6-8	3	0,318	0,111			
Gesunde	14	0,414	0,094	- 0,77	0,457	NS
Karzinome	10	0,489	0,297			
Gesunde	14	0,414	0,094	- 0,28	0,801	NS
Karz. 1-4	4	0,445	0,215			
Gesunde	14	0,414	0,094	- 0,52	0,656	NS
Karz. 5-7	3	0,514	0,332			
Gesunde	14	0,414	0,094	- 0,41	0,719	NS
Karz. 8-10	3	0,524	0,460			
Adenome	8	0,902	0,512	2,15	0,048	S
Karzinome	10	0,489	0,297			
Ade. 1-5	5	1,252	0,210	5,09	0,000	HS
Karzinome	10	0,489	0,297			
Ade. 6-8	3	0,318	0,111	- 0,95	0,362	NS
Karzinome	10	0,489	0,297			

S = Signifikant

HS = Hochsignifikant

NS = nicht Signifikant

* = Gruppeneinteilung entsprechend Tabelle 3

SD = Standardabweichung

P = Irrtumswahrscheinlichkeit

Tabelle 6: t-Test der LF Konzentrationen in Prostatageweben

Gruppe*	n	$\mu\text{g LF/g Gewebe}$ $\bar{X}$	SD	t-Wert	P	Signifikanz- niveau
Ade.01-17	17	122,24	62,9	- 7,91	0,00	HS
Ade.18-20	3	426,76	48,2			
Ade.01-17	17	122,24	62,9	5,82	0,00	HS
Karzinome	5	32,14	5,8			
Adenome	20	167,93	126,6	4,78	0,00	HS
Karzinome	5	32,14	5,8			

Gruppe	n	$\mu\text{g LF/mg Protein}$ $\bar{X}$	SD	T-Wert	P	S
Ade.01-17	17	4,29	2,9	-6,42	0,00	HS
Ade.18-20	3	15,87	2,4			
Ade.01-17	17	4,29	2,9	4,79	0,00	HS
Karzinome	5	0,87	0,2			
Adenome	20	6,03	5,1	4,53	0,00	HS
Karzinome	5	0,87	0,2			

S = Signifikant

HS = Hochsignifikant

NS = nicht Signifikant

SD = Standardabweichung

P = Irrtumswahrscheinlichkeit

* = Gruppeneinteilung entsprechend Tabelle 4

Der t-Test erbrachte folgende Ergebnisse:

Die mittlere LF-Konzentration im Plasma von gesunden Männern unterschied sich signifikant von derjenigen bei Männern mit Prostataadenomen. Dies wurde durch die Aufteilung in zwei Adenomgruppen noch deutlicher.

Plasmen von gesunden Männern und Patienten mit Prostatakarzinomen unterschieden sich dagegen nicht signifikant. Weiterhin ergab der direkte Vergleich zwischen Adenom- und Karzinomplasmen statistisch signifikante und nach Unterteilung der Adenome hochsignifikante Unterschiede.

Entsprechend der erhöhten LF-Konzentration im Plasma von Patienten mit Prostataadenomen wurden auch höhere Konzentrationen in Prostataadenomgeweben festgestellt. Verglichen mit Karzinomgewebe war LF bezogen auf Gewebe und Protein hochsignifikant erhöht.

6.4. LF in der Zellkultur von Prostatakarzinomzellen

Es wurde untersucht, ob Prostatakarzinomzellen in einer Zellkultur LF produzieren und in das Medium sezernieren können.

Zu diesem Zweck wurde das Wachstum von LNCaP-Zellen aus der Zelllinie eines androgensensiblen Prostatakarzinoms durch Testosteron und ein noch potenteres wachstumstimulierendes Androgen, Methyltrienolon, stimuliert und LF im Kulturmedium bestimmt. Die Zellkulturen wurden freundlicherweise von Dr.Fittler zur Verfügung gestellt.

Das Zellkulturmedium war mit steigenden Konzentrationen der jeweiligen Androgene versetzt worden. An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden je 100 µl des Mediums entnommen und mit dem ELISA-Test gemessen.

Tabelle 7: Inkubation mit Testosteron

Testosteron µg/ml Medium	1.	2.	3. Tag
10	3,7	-	3,5 ng LF/ml Medium
20	4,0	3,1	4,2 ng LF/ml Medium
50	4,0	4,2	4,0 ng LF/ml Medium

Tabelle 8: Inkubation mit Methyltrienolon

Methyltrienolon 2. µg/ml Medium	2.	3.	5. Tag
Kontrolle	2,0	2,0	2,0 ng LF/ml Medium
0,1	6,8	2,0	2,0 ng LF/ml Medium
1,0	2,0	6,8	6,8 ng LF/ml Medium
10,0	2,4	6,8	4,0 ng LF/ml Medium

Es konnte nicht nachgewiesen werden, daß durch die androgene Wachstumsstimulation gleichzeitig LF vermehrt produziert und in das Medium sezerniert wurde. Die geringen LF-Mengen des Mediums standen in keinem direktem Zusammenhang mit Androgendosis und Inkubationsdauer.

DISKUSSION

Affinitätschromatographie

ATP-Sepharose ist ein Affinitätsgel, das auch Aktivität als Kationenaustauscher besitzt (39). Somit könnte eine Bindung von LF an das Gel durch Affinität, Kationenaustausch, oder eine Überlagerung beider Effekte zustande kommen. Bennett (11) hatte bereits eine Affinität zwischen LF und Kationenaustauschern beobachtet. Die Notwendigkeit hoher Ionenstärken bei der Abtrennung von LF aus ATP-Sepharose (0,7 M NaCl) sprach aber eher gegen einen Ionenaustausch als Grundlage der Affinität.

Wie bei der Chromatographie mit Phosphoglyceratkinase gezeigt worden war (49), erfolgte die spezifische Elution von PGK mit dem freien ATP-Mg²⁺ Komplex erst ab einer ATP-Konzentration von 40 mM. Die Notwendigkeit einer derartig hohen Konzentration von ATP-Mg²⁺ erklärte sich durch die 27fach höhere Affinität von PGK zu ATP-Mg²⁺-Spacer, verglichen mit der Affinität zu ATP-Mg²⁺ (49).

Lactoferrin könnte ebenfalls eine größere Affinität für den Ligand-Spacer-Komplex besitzen. Auf einen Beweis dieser Hypothese, d.h. auf eine Elution mit ATP mußte verzichtet werden, da der spezifische Nachweis von LF mittels ELISA nicht sofort während der Chromatographie erbracht werden konnte, und die Absorptionsmessung bei 280 nm wegen der gleichzeitigen Absorption von ATP bei dieser Wellenlänge nicht möglich gewesen wäre. Die Chromatographie hätte somit nicht ausgewertet werden können.

Die gewonnenen Daten sprechen aber für eine biospezifische Bindung von LF an ATP-Sepharose. Kriterien für diese Annahme (40) sind einmal die geringe Bindung an Spacer-Sepharose mit einem Maximum der Abtrennung bereits bei niedrigen Salzkonzentrationen.

An ATP-Sepharose konnte LF trotz hoher Salzkonzentrationen (maximale Ablösung bei 0.65 M NaCl) stabil binden. Für eine spezifische Bindung an das Gel sprach auch der Vergleich der Bindungsqualitäten bei verschiedenen pH-Werten. Trotz der negativen Bruttoladung von LF im alkalischen Milieu wurde hier die stärkste Bindung erzielt. Die verringerte Bindungsfähigkeit im sauren Bereich könnte mit der verminderten Eisenbindungs-kapazität bei niedrigen pH-Werten zusammenhängen. Gereinigtes LF verliert bei pH-Werten unter 5 bis zu 90 % seiner Eisenbindungs-kapazität (42).

Bindung an verschiedene Sepharoseliganden

Bei der Interpretation der hier vorliegenden Daten muß berücksichtigt werden, daß die Auswertung nur über die Extinktion erfolgte, wobei die hohen Basalwerte die kleineren ersten Peaks verhältnismäßig stärker vergrößerten, als die höheren zweiten Peaks. Peak 1 ist demnach bei allen folgenden Chromatographien relativ erhöht.

Die Chromatographie von LF über Sepharosen mit verschiedenen Liganden zeigte, daß LF an Purin- und Pyrimidinliganden spezifisch bindet. Die Bindung an die Nucleoside und Nucleotide dieser beiden Basentypen war jedoch verschieden. An das Purin-nucleosid Adenosin und dessen Nucleotide wurde LF stärker gebunden als an Cytidin, und dieser Unterschied wurde mit zunehmendem Phosphorylierungsgrad noch deutlicher.

Es stellt sich die Frage, weshalb LF besser an Purinabkömmlinge bindet, obwohl freie Purin- und Pyrimidinbasen sehr ähnliche chemische Eigenschaften besitzen. Ein Unterschied liegt in der Anzahl der in den Ringen gebundenen Stickstoff-Atomen, die als schwache Basen (pK 9-10) bei pH 7,8 protoniert vorliegen.

Lactoferrin mit einem Isoelektrischen Punkt von 6,9 (11), besitzt bei diesem pH theoretisch eine negative Nettoladung, so daß eine unterschiedliche elektrostatische Anziehung vermutet werden könnte.

Bennett (11) führte die Interaktion zwischen DNA und LF auf eine elektrostatische Bindung zurück, die abhängig ist von der Zahl der negativen Ladungen der DNA, obwohl LF bei dem von Bennett verwendeten pH von 7,4 eigentlich keine positive Nettoladung besitzt und sich deshalb nicht wie ein basisches Protein verhalten dürfte. Die spezifische Bindung auch an Nucleoside zeigte, daß die Bindung nicht allein von der Phosphorylierung des Nucleosids abhängig war. Das unterschiedliche Bindungsverhalten bei verschiedenem Phosphorylierungsgrad könnte darauf hinweisen, daß zwei LF-Formen vorlagen, die je nach Ladungsbedingungen ineinander überführt werden konnten.

Bei der Chromatographie über Adenosin-Sepharose lag ein großer Teil von LF in einer Form vor, die weder binden, noch in die andere LF-Form überführt werden konnte. Bei der Chromatographie über AMP-Sepharose wurde LF am stärksten gebunden, jedoch war Peak 2 etwas verbreitert.

Die Affinitäts-Chromatographien von LF über verschiedene Sepharosegele ergaben eine maximale Bindung von 88% des aufgetragenen Proteins. Wie die Re-Chromatographie der beiden Peaks zeigte, lag dies nicht an einem Überschreiten der Bindungskapazität des Gels, sondern muß auf Varianten von LF zurückgeführt werden. Die Re-Chromatographie von Peak 2 ergab das bekannte Elutionsmuster, bei dem ein Teil des Proteins wiederum nicht an ATP-Sepharose binden konnte. Der gebundene Anteil betrug 71%, was der normalen Ausbeute entsprach.

Es stellt sich die Frage, ob der nicht gebundene Anteil von LF auf das Vorliegen eines Fremdproteins zurückzuführen war, oder LF als heterogenes Protein mit reversibel ineinander überführbaren Formen vorlag. Für die letztere Hypothese sprachen vor allem die Bindungsversuche an verschiedene Sepharoseliganden.

Ein Teil der Liganden von ATP-Sepharose lag möglicherweise als ADP-, AMP- oder Adenosin-Liganden vor. Die unterschiedliche Affinität von multiplen LF-Formen für diese Liganden könnte für das heterogene Bindungsverhalten verantwortlich sein. Da der Anteil dieser Nebenliganden gering ist (40), war auch die Kapazität der Säule für Proteine mit Bindungsfähigkeit für diese Liganden schnell erschöpft.

Auch in der Literatur gibt es Hinweise, daß LF als polymorphes Protein vorliegt. Chromatographien von LF aus Tränensekret von Rind über CM-Sephadex und DEAE-Sephacel ergaben zwei Banden (5,18); das gleiche gilt für die Chromatographie von LF aus Humanserum über Sephadex G-200 (9). Es wird vermutet, daß Peak 1 einen LF-Nukleoproteinkomplex repräsentiert, während Peak 2 das reine Protein darstellt (9).

Bei der Chromatographie über Kupfer-Chelat-Sepharose 6B wurden ebenfalls zwei LF Banden erhalten (43,58), und Versuche zur Bindung von LF aus Human-Kolostrum an Kolostrumzellen ergaben zwei Bindungstypen (46).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß LF ein Isoprotein ist und als Polymer oder als Komplex mit Proteinen, Nucleinsäuren- oder Salzen vorliegt. Eventuell existieren in den verschiedenen Sekreten Lactoferrine unterschiedlicher Quartiärstruktur.

Die Elutionsdiagramme von LF aus Humankolostrum und Humanseminalplasma waren jedoch gleich. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß diese Lactoferrine gleiche Biospezifität für ATP-Sepharose besitzen.

Eine andere Ursache für das Bindungsverhalten von LF könnte die Blockierung von Bindungsstellen für ATP-Sepharose sein. Die Elutionsdiagramme nach Dialyse mit Nucleotiden und Nucleosiden zeigten jedoch, daß die LF-Bindungsstellen für ATP-Sepharose weder eindeutig durch Dialyse besetzt werden, noch eventuell gebundene Inhibitoren abgetrennt werden konnten. Auch bestand kein eindeutiger Unterschied nach Dialyse mit Nucleosiden/tiden und mit Purinen/Pyrimidinen.

Die Chromatographien nach Dialyse mit steigenden ATP-Konzentrationen lassen vermuten, daß die spezifischen Bindungszentren nicht besetzt waren. Möglicherweise bestand eine partielle Komplexbildung mit Purinen oder Pyrimidinen, die das Bindungsverhalten schwach beeinflusste.

Bindung an Nucleinsäuren

Die Bindungsversuche an verschiedene Nucleosid- und Nucleotidliganden haben gezeigt, daß LF eine spezifische Aktivität für diese Liganden besitzt. Die Interaktion mit DNA, und vor allem eine bevorzugte Bindung bestimmter Nucleotide oder Nucleotidsequenzen, könnte eine Beteiligung von LF bei der Kontrolle der Genexpression nahelegen. So wird vermutet, daß LF über einen derartigen Mechanismus in die Regulation der Myelopoese eingreift (22). Aus neutrophilen Granulozyten freigesetztes LF unterdrückte als physiologischer "feed back" Inhibitor die Synthese eines, die Proliferation der myeloischen Zellreihe, stimulierenden Proteins (22). Der Mechanismus, über den LF die Synthese spezifischer Proteine beeinflusst, ist bis heute noch nicht geklärt. Die Interaktion mit DNA könnte hierbei jedoch eine relevante Rolle spielen.

In der Literatur ist über die Bindung von LF an DNA mehrfach berichtet worden. Bennett (11) zeigte mit indirekter Immunfluoreszenz eine Bindung von LF an Zellkerne. Weiterhin kann LF an DNA binden und zwar präferentiell an dsDNA. In vitro dissoziierte LF bereits gebildete DNA-antiDNA Immunkomplexe. Die Interaktion zwischen LF und DNA verhinderte partiell die Bindung von antiDNA-Antikörpern an DNA, bei Patienten mit Lupus erythematodes (11).

Weitere Arbeiten von Bennett (12) ergaben, daß jedes DNA-Molekül viele LF-Moleküle bindet, und daß in vitro an Zellmembran gebundene DNA als Rezeptor für exogenes LF fungieren kann.

Wie die vorliegenden Untersuchungen zur Bindungsspezifität gezeigt haben, wurde die stärkste Bindung mit AMP-Sephrose erhalten. Diese größere Affinität an das einfach phosphorylierte Nucleosid könnte darauf hinweisen, daß bei der DNA-Bindung in vivo Phosphodiesterbrücken der DNA an der Bindung beteiligt sind.

Die Hypothese einer spezifischen Bindung an DNA wird durch die Arbeiten von Cuatrecasas und Halenberg (24) unterstützt: Die Autoren beschrieben eine Calciumabhängige Bindung mit hoher Affinität, welche durch die Behandlung mit DNase zerstört wurde.

Bei der Isolierung von LF aus Mammarydrüsenengewebe enthielt das gereinigte LF 3,3 % RNA (44), und es wird deshalb vermutet, daß LF auch RNA binden kann. Diese Bindung ging jedoch nicht mit einer RNase-Wirkung von LF einher. Die LF-Aktivität war im Vergleich zur RNase Aktivität verschwindend gering und es ist unwahrscheinlich, daß LF in vivo eine solche Aktivität besitzt.

Affinitäts-Chromatographie von Seminalplasma

Die hier angewandte Reinigungsmethode für LF aus Seminalplasma stellt eine Ergänzung zu den in der Literatur beschriebenen Methoden dar. Mit nur zwei Arbeitsschritten (Zentrifugation und Chromatographie) wurde LF vorgereinigt und angereichert. Es ist zu erwarten, daß mit einer anschließenden Molekularsieb-Chromatographie eine vollständige Reinheit erzielt werden könnte.

Tabelle 9 zeigt einen Vergleich der Isolierungsverfahren:

Tabelle 9: Isolierung von LF, Literaturvergleich

Literatur	Material	Vorbereitende Methode	Chromatographie	Ausbeute	Anreich.	Reinheit
43 58	Human-Milch Granulozyten	Zentrifug. + Säurefällung	1. Cu-Chelatsepharose 4-B 2. Sephadex G-150	100% 90%	- -	Immunelpho: nach 2.Schritt rein
18	Human-Milch	Zentrifug. + Säurefällung	1. Heparin-Sepharose 4-B 2. DEAE-Cellulose 3. Sephadex G-200/ G-75	- - 83,7 %	- - -	Ochterlony: nicht rein PAGE: nach 2.Schritt Peak 1 = rein Peak 2 = + Fremdproteine
63	Pankreassekret	-	Heparin-Sepharose 4-B	-	-	Ochterlony: rein
8 5	Human-Milch Hu.Tränensekr.	Zentrifug. + AS - Fällung	1.DEAE Sepharose 4-B 2. Sephadex G-75 / G-100	- -	- -	Nach 2.Schritt: PAGE: rein
53	Human-Milch	Zentrifug. + AS - Fällung	CM-Sepharose (Batch)	-	-	Immunelpho: rein
64	Human-Milch	-	IgA-Sepharose 4-B	bindet nicht	-	-
Eigene Ergebnisse	Seminalplasma	Zentrifugat.	ATP-Sepharose	32%	7,5 fach	SDS - PAGE: 5 Fremdprotein- banden

AS = Ammoniumsulfat

Bei den in der Literatur beschriebenen Methoden waren je nach Ausgangsmaterial drei bis fünf Arbeitsschritte notwendig (Fettextraktion, Proteinfällung, Affinitäts- oder Ionenaustausch-Chromatographie, Molekularsieb-Chromatographie). Quantitative Angaben über Ausbeute und Anreicherung wurden nur in wenigen Fällen gemacht. Angaben zur Reinheit waren zum Teil widersprüchlich (Tab.9, 18,63).

Die im ELISA-Test nachgewiesenen geringen Ausbeuten bei der Chromatographie von Seminalplasma über ATP-Sepharose, sind wahrscheinlich auf Veränderungen der Antigenität von LF zurückzuführen. Möglicherweise verliert LF während der Chromatographie sukzessive Kohlenhydratgruppen welche als antigene Determinanten fungierten, wodurch LF in dem verwendeten ELISA-Test nicht mehr nachweisbar war. Hohe Salzkonzentrationen bei der Ammoniumsulfat-Fällung verminderten das nachweisbare LF ebenfalls. Die scheinbar geringe Ausbeute konnte somit durch die verminderte Nachweisbarkeit von LF im ELISA-Test erklärt werden. Bei den Chromatographien von gereinigtem LF konnten durch Absorptionsmessung bei 280 nm immer 100 % des aufgetragenen LF im Eluat bestimmt werden.

Dem Auftreten von LF-Doppelbanden in der SDS-PAGE sollen Beobachtungen aus der Literatur gegenübergestellt werden:

Bennett (9) zeigte, daß die Lactoferrine der verschiedenen Humansekrete in der PAGE unterschiedliche elektrophoretische Mobilität besaßen, die sich noch zusätzlich mit dem Reinheitsgrad veränderte. Isoliertes Lactoferrin wanderte langsamer als alle anderen Lactoferrine und auch langsamer als Apo-LF. Es wird vermutet, daß natives LF als Komplex vorliegt und dadurch die Wanderungsgeschwindigkeit verändert wird.

Auch in Rindermilch gibt es mehrere LF-Formen (5), wobei eine Form nicht an CM-Sephadex bindet. Die andere Form bindet und besitzt eine größere elektrophoretische Mobilität.

Einfluß von Eisen auf den Nachweis von Lactoferrin und physiologische Bedeutung der Lactoferrin-Eisen-Bindung

Bennett (8) fand in einem RIA-System eine bessere quantitative Ausbeute von Apo-LF (Eisenfreies LF) gegenüber eisengebundenem LF. Er vermutete deshalb, daß eine Ursache für die Bestimmung von verschiedenen LF-Konzentrationen im Plasma, die je nach physiologischen und pathologischen Bedingungen, unterschiedliche Eisensättigung von LF im Plasma sein könnte.

Eine Änderung der immunologischen Eigenschaften in Abhängigkeit vom Eisengehalt, könnte auch den spezifischen LF-Nachweis mit dem ELISA-Test beeinflussen. Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

In einem anderen ELISA-Testsystem für LF wurde ebenfalls eine, von der Eisensättigung unabhängige, exakte LF-Bestimmung festgestellt (28). Deshalb wurde bei den weiteren LF-Messungen mit ELISA ein möglicher Einfluß durch den Eisengehalt nicht berücksichtigt.

Während der Affinitäts-Chromatographie war die Eisenkonzentration bei allen Arbeitsschritten relativ konstant, die tatsächliche Eisensättigung von LF war jedoch nicht bekannt. Die Eisenbindungskapazität von gereinigtem LF bleibt bei pH 7,4 über 4 Stunden nahezu völlig erhalten (42) und es ist zu vermuten, daß bei dem für die Affinitäts-Chromatographie verwendeten pH 7,8 ebenfalls nahezu vollständige Bindungskapazität für Eisen vorlag.

Lactoferrin besitzt im Vergleich zu den Transferrinen eine stärkere Eisen-Affinität. K_1 für Fe (III) ist bei pH 6,4 - 6,7 260fach größer; außerdem ist die Bindung resistenter gegenüber der Abtrennung durch Protonen. Lactoferrin ist erst bei pH 2 eisenfrei, während Transferrin Eisen schon bei pH 4 freisetzt (15).

Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auch mitverantwortlich für die verschiedenen Rollen der beiden Glycoproteine bei der Abwehr bakterieller Infektionen:

1.) Bei lokalen gewebssentzündlichen Prozessen wird Apo-LF aus den neutrophilen Granulozyten freigesetzt. Es wurde beobachtet, daß LF in der frühen Phase einer bakteriellen Gelenkentzündung in der Synovialflüssigkeit um das 2lfache, und bei bakteriellen Pneumonien und Meningitiden innerhalb von zwei Tagen im Plasma um das 3-4fache ansteigt (37).

Der erniedrigte pH in entzündlichem Gewebe führt zur präferentiellen Eisenbindung an LF (gegenüber Transferrin), dadurch sinkt der freie Eisen-Spiegel und das eisenabhängige Wachstum von Mikroorganismen wird inhibiert. Mikroorganismen, die unter diesen Bedingungen wachsen können, (Gesamteisen in Humanplasma = 2×10^{-5} M und freies Eisen = 10^{-8} M) besitzen jedoch die Möglichkeit, proteingebundenes Eisen zu assimilieren. Siderophoren und Siderochrome von E.coli, Pseudomonas, Vibrionen und Salmonellen bewirken eine Eisenextraktion aus Proteinen und ermöglichen die Eisenaufnahme über Chelataion. Die Affinitätskonstanten bakterieller Chelatatoren sind aber niedriger als von LF, sie sind vergleichbar mit der von Transferrin (65).

Eisenkonkurrenz ist sicherlich nur einer der Mechanismen zur Infektabwehr. Es gibt auch Beweise für eine direkt bakterizide Wirkung von Human-LF (3).

So wurde für Streptococcus mutans und Vibrio cholerae ein direkt bakterizider LF-Effekt, unabhängig von einer nutritiven Eisen-Konkurrenz nachgewiesen. Die optimale Hemmung des Wachstums von Streptococcus mutans wurde in vitro bei einer Konzentration von 0,2 µM Apo-LF und 120 µM Eisen erreicht, obwohl in diesem Ansatz die Mindestkonzentration von LF für eine quantitative Eisenbindung 300fach unterschritten war (1 Mol LF bindet 2 Mol Fe(III)).

Eine Hypothese für den direkt bakteriziden Effekt, ist die mögliche Rolle von LF als Regulator der Hydroxylradikal-Produktion der neutrophilen Granulozyten (2).

Lactoferrin katalysiert die Produktion von Hydroxylradikalen, welche durch ihren extrem oxidierenden Effekt organische Moleküle zerstören können. Dadurch erhöht LF direkt die antibakterielle Aktivität der neutrophilen Granulozyten. Dieses Ergebnis konnte jedoch von Winterbourn (66) nicht bestätigt werden.

2.) Im Gegensatz zu lokalen Entzündungen fällt bei generalisierten Infektionen der Blut-pH nicht signifikant unter pH 7,3. Plasmaeisen wird bei diesem pH überwiegend von Transferrin gebunden.

Untersuchungen von Van Snick (61) zeigen jedoch, daß LF auch bei generalisierten akuten Entzündungen eine Rolle spielt und möglicherweise sogar pathogenetisch an der Auslösung einer Eisenmangelanämie bei chronischen Erkrankungen beteiligt sein könnte. Bei einer durch Endotoxingabe induzierten akuten generalisierten Entzündung bei Ratten, bewirkte die Gabe von Apo-LF eine Hypoferrämie. Möglicherweise konnte Apo-LF Eisen aus Transferrin freisetzen, als eisengesättigtes LF an Rezeptoren von Makrophagen binden und nach Endocytose, Eisen in die Zelle abgeben (62).

Dies könnte eine Ursache sein für die häufig diagnostizierte Eisenmangelanämie bei chronischen Erkrankungen.

Lactoferrin als Markerprotein benigner und maligner Erkrankungen

In der Literatur gibt es Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Veränderungen der LF-Konzentration im Blut und in Geweben und dem Auftreten von benignen und malignen Erkrankungen. Darauf soll nun unter Berücksichtigung eigener Daten näher eingegangen werden.

1. Lactoferrin im Plasma

Tabelle 10 zeigt einen Vergleich der LF-Konzentrationen aus Plasma gesunder Personen.

Tabelle 10: LF im Plasma, Literaturvergleich

Literatur	$\bar{X}$ LF [$\mu\text{g/ml}$]	SD	Methode	gesunde Probanden
32	0,395	-	RIA	Erwachsene
7	0,550	-	RIA	Erwachsene
15	0,250	0,150	RIA	Erwachsene
20	1,345	0,275	RIA	Erwachsene
30	0,275	0,145	RIA	Erwachsene
10	0,888	0,334	RIA	Erwachsene
21	0,500	0,250	RIA	Erwachsene
52	0,160	0,140	ELISA	Erwachsene
28	0,134	0,079	ELISA	Erwachsene
9	1,100	0,060	RIA	Männer
9	1,020	0,080	RIA	Frauen > 50 Jahre
9	0,760	0,030	RIA	Frauen < 50 Jahre
8	1,620	-	RIA	Männer
8	1,070	-	RIA	Frauen
8	1,740	-	RIA	Frauen, Postmenopause
8	0,750	-	RIA	Frauen, Praemenopause
14	0,241	-	ELISA	Erwachsene
16	0,100	-	ELISA	Erwachsene
Eigene Daten	0,414	0,094	ELISA	Männer

Die LF-Werte aus Tabelle 10 sind sehr verschieden. Dies könnte an den unterschiedlichen Nachweismethoden liegen, die hohen Konzentrationen könnten jedoch durch längeres Stehenlassen des Blutes bei Raumtemperatur verursacht worden sein. Dadurch kommt es zur raschen Degranulation der neutrophilen Granulozyten, wodurch LF freigesetzt wird (22).

Das Lactoferrin des Plasmas stammt zu einem großen Teil aus den neutrophilen Granulozyten und es ist deshalb wahrscheinlich, daß Konzentrationsänderungen in erster Linie einen veränderten Aktivationszustand der Granulozyten reflektieren (15). In einigen Untersuchungen korrelierte die LF-Konzentration mit der Granulozytenzahl (15, 21), in einer anderen Studie konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (9).

Aufgrund dieser Beobachtungen können bei Erkrankungen, welche mit einer veränderten LF-Konzentration des Plasmas einhergehen, zwei Gruppen unterschieden werden:

Zu den Erkrankungen mit verändertem Granulozytenstatus gehören die Polyzythämie (67), sowie die akute und chronische myeloische Leukämie (8) mit erhöhten LF-Konzentrationen; und die Agranulozytose, bei der kein LF im Plasma nachgewiesen wurde (10). Weiterhin war LF bei akuten Infektionen erhöht (32).

Andere Beobachtungen machen es jedoch wahrscheinlich, daß neben den Granulozyten noch weitere Faktoren die LF-Konzentration beeinflussen. So ist zum Beispiel ein hormoneller Einfluß durch Östrogen bekannt (8,9,57). Dies erklärt Konzentrationsschwankungen in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter (siehe Tab.10; 8 und 9). Aber auch andere Hormone, gewebespezifische Sekrete und Gewebeerfallsprodukte können sich auf das Plasma-LF auswirken und bei Organerkrankungen zu Konzentrationsveränderungen führen.

Erkrankungen ohne Veränderung des Granulozytenstatus sind zum Beispiel Mucoviscidose und Leberzirrhose mit erhöhten LF-Konzentrationen (7). Unter den malignen Erkrankungen wurde für das Mammakarzinom ein nicht signifikant erhöhter Plasmaspiegel für LF beschrieben (45). Dies konnte jedoch in einer anderen Studie (14) nicht bestätigt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben eine signifikant erhöhte Plasmakonzentration bei Patienten mit Prostataadenom. Bei Patienten mit Prostatakarzinom lag die Konzentration jedoch innerhalb des Normalbereichs, sie war unabhängig vom Differenzierungsgrad des Tumors und unabhängig von der lokalen Tumorausdehnung und dem Befall der Lymphknoten. Die ursprüngliche Beobachtung einer erhöhten LF Konzentration bei einigen Patienten mit Prostatakarzinom (ohne gleichzeitige adenomatöse Veränderung) konnte also nicht bestätigt werden.

2. Lactoferrin in pathologisch veränderten Geweben

Normales Mammeepithelzellgewebe, sowie die verschiedenen Stadien der Mastopathia fibrosa waren bei Immunfluoreszenzmessungen LF-positiv. In karzinomatös verändertem Mammagewebe wurde dagegen kein LF gefunden (54,67). In einer anderen Studie (36) war LF in Mammakarzinomgewebe gegenüber verschiedenen Mastopathiestadien signifikant erniedrigt.

Untersuchungen an Mammakarzinomgeweben ergaben in vivo (45) und in vitro an Gewebekulturen (36,45) geringere LF-Konzentrationen in niederdifferenzierten Karzinomen gegenüber hochdifferenzierten Tumoren. Wurster et al. (67) konnten dagegen keinen Zusammenhang zwischen Tumordifferenzierung und LF-Konzentration finden. Ebenfalls keine Korrelation bestand zwischen der Konzentration von LF im Tumorgewebe und der Ausbildung von Metastasen (13).

Untersuchungen gastrointestinaler Organe ergaben, daß LF in Pankreassekret enthalten ist, die Konzentrationen jedoch bei der akuten und chronischen Pankreatitis, dem Pankreaskarzinom und anderen intestinalen Störungen keine signifikanten Unterschiede zeigen (50). In der Mukosa von Antrum und Fundus wurde bei gastral Metaplasien kein LF nachgewiesen (59).

Nach diesen Ergebnissen ist LF als Markerprotein für Malignome der Mammæ, des Magens und des Pankreas nicht geeignet.

In Tumorgewebe maligner Lymphome (Morbus Hodgkin und Burkitt Lymphom) konnte LF nachgewiesen werden (35). Die Autoren vermuten jedoch, daß dies auf die reaktive Freisetzung von LF aus neutrophilen Granulozyten zurückzuführen ist.

Bei qualitativen Untersuchungen mittels radialer Immundiffusion an Prostatagewebsschnitten wurde LF in Adenomen und Karzinomen nachgewiesen. Loisillier et al. fanden in Prostatakarzinomen höhere Konzentrationen (44); in einer späteren Arbeit wurden jedoch in Adenomen und Karzinomen gleich niedrige Konzentrationen festgestellt (60).

Die eigenen Untersuchungen ergaben eine signifikant erhöhte LF-Konzentration in Gewebe von Prostataadenomen gegenüber Karzinomen. Zusammen mit den erhöhten Plasmakonzentrationen könnte dieses Ergebnis zur Diagnose des Prostataadenoms und damit indirekt auch des Prostatakarzinoms beitragen.

Das obstruierende Prostataadenom stellt, als häufigste Form von Blasenentleerungsstörungen bei Männern über 60 Jahren, die wichtigste Differentialdiagnose zum Prostatakarzinom dar. Ein suspekter rektaler Palpationsbefund mit erhöhter LF-Plasmakonzentration würde die Verdachtsdiagnose Adenom nahelegen; ein suspekter Palpationsbefund mit gleichzeitig normaler Plasmakonzentration würde dagegen ein Karzinom wahrscheinlicher machen. Die bisherigen Diagnosekriterien versagen, wie schon erwähnt, vor allem in den frühen Tumorstadien häufig.

Bei der rektalen Palpation werden vor allem anterolaterale Infiltrationen oft nicht erkannt. Die Phosphatasen erreichen meist erst dann pathologische Werte, wenn der Tumor die Organkapsel bereits überschritten hat, oder Metastasen vorhanden sind. Sonographisch kann ab Stadium T₁₋₂ eine Initialdiagnose gestellt werden, die jedoch bei fehlender Histopathologie nur als Verdachtsdiagnose gelten kann (33). Erst bei einer organüberschreitenden Tumorausdehnung kann sonographisch eine gesicherte Diagnose gestellt werden (23). Radiologische Methoden wie i.v. Urogramm und Skelettszintigraphie sind anfangs unauffällig, Biopsien haben in 10 - 30 % ein falsch negatives Ergebnis (30).

Für die Früherkennung von Patienten mit hohem Risiko für ein Prostatakarzinom, könnte ein Diagnoseschema nützlich sein, bei dem die bisherigen Untersuchungen (rektale Palpation, Plasma-Phosphatasen, Sonographie, i.v.Urographie, Prostatabiopsie und Skelettszintigraphie) kombiniert werden, mit der Messung von LF aus Plasma und Gewebebiopsie.

Die zusätzliche Bestimmung von LF im Prostataexprimat könnte möglicherweise diagnostisch wertvoll sein, da dieses Sekret die metabolische Aktivität der Prostata-Epithelzellen reflektiert. Benigne und maligne Veränderungen der Prostata beeinflussen die spezifische Sekretion und damit die Zusammensetzung des Exprimates. So sind zum Beispiel beim Prostatakarzinom im Exprimat C₃-Komplement und Transferrin erhöht, und es besteht eine Prädominanz für LDH 4 und 5 (31, 30).

Die Relevanz der hier durchgeführten LF-Studie müßte durch Untersuchungen an einer umfangreicheren Stichprobe überprüft werden. Weiterhin sollten im Rahmen einer Multivarianzanalyse die Korrelationen zwischen den LF-Konzentrationen des Plasmas und des Prostatagewebes bestimmt werden. Dies war in der vorliegenden Studie nicht möglich, da Plasmen und Gewebeproben von verschiedenen Patienten stammten.

AUSBLICK

Lactoferrin ist ein eisenbindendes Protein, das in den meisten Körpersekreten vorkommt und antiinfektiöse Wirkung besitzt.

Derartige natürlich auftretende, antibakterielle Proteine sind von großer Bedeutung, da sie als potentielle Antibiotika therapeutisch relevant werden könnten.

In diesem Zusammenhang könnte die Bindung von LF an DNA und RNA eine Rolle spielen. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, bindet LF spezifisch an Nucleotide, und es wäre somit denkbar, daß LF direkt in die Regulation von Transkription und Translation involviert ist. Über eine Kontrolle der Genexpression könnte beispielsweise die Regulation der Leukozyten-Proliferation stattfinden. In diesem "feed back" Zyklus hemmt LF die Synthese von Proteinen, welche die Zellproliferation aktivieren (12).

Zur Rolle von LF als diagnostisches Markerprotein konnte eine weitere Aussage gemacht werden: Aus der Literatur geht hervor, daß LF bei den bisher untersuchten Malignomen kein spezifisches Tumorprodukt war. Auch das ubiquitäre Auftreten von LF signalisiert eher eine generelle Wirkung.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen signifikant erhöhte LF-Konzentrationen im Plasma und Prostatagewebe von Patienten mit Prostataadenom, gegenüber normalen Konzentrationen bei Patienten mit Prostatakarzinom. Lactoferrin kann also ein Marker für benigne Veränderungen sein.

Die Messung von LF in Plasma und Prostatagewebe könnte auch die Frühdiagnose des Prostatakarzinoms verbessern. Das Prostataadenom könnte als häufigste Differentialdiagnose ausgeschlossen werden. Normale LF-Konzentrationen würden, vor allem in Kombination mit pathologischen Tumormarkern des Prostataexprimates, ein Karzinom anzeigen.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde Lactoferrin mit einem ELISA-Test, modifiziert nach Engvall (26), gemessen, der spezifisch, sensitiv und gut reproduzierbar war und somit eine einfache Methode für den Nachweis von LF darstellte. Die Intra- und Intertestvariationen lagen innerhalb der Grenzen von 10 %, die in der Literatur für ähnliche immunologische Testsysteme angegeben werden (14,16,19,28,).

Die Affinitäts-Chromatographien über verschiedene Sepharose-Gele zeigten, daß LF spezifisch an Nucleosid- und Nucleotidliganden bindet. Für eine biospezifische Bindung sprach deren Stabilität bei hohen Salzkonzentrationen (eine Ablösung des Proteins erfolgte erst ab 0,5 M NaCl bei pH 7,8) und die Tatsache, daß LF bei pH 7,8 am besten binden konnte, trotz gleichgerichteter negativer Ladungen von LF und ATP-Sepharose bei diesem pH Wert. Die stabilste Bindung erfolgte an Purin-Liganden, insbesondere den einfach phosphorylierten Liganden AMP. Alle Chromatographien wurden bei Eisenüberschuß durchgeführt.

Die Bindungsexperimente zeigten auch, daß LF ein heterogenes Protein ist und sich in seiner Bindungsfähigkeit an Sepharose Gele nicht einheitlich verhielt.

Die Affinitäts-Chromatographie von Seminalplasma über ATP-Sepharose ist ein neues Verfahren, LF aus Sekreten anzureichern und zu reinigen. Mit nur einem Arbeitsschritt wurde eine 7,6fache Anreicherung erzielt, bei einer Ausbeute von 32 % (gemessen im ELISA-Test). Die Proteinausbeuten der Chromatographien von gereinigtem LF waren jedoch 100 %. Die niedrige LF-Ausbeute ist wahrscheinlich auf immunologische Veränderungen von LF zurückzuführen, die einen Nachweis mit dem Elisa-Test nicht mehr quantitativ ermöglichten.

Die tatsächliche Ausbeute und Anreicherung sollte somit höher sein.

Die Untersuchungen über LF bei urologischen Erkrankungen brachten folgende Ergebnisse:

Patienten, die an einem Prostataadenomen erkrankt waren, hatten gegenüber gesunden Männern eine signifikant erhöhte LF-Konzentration des Plasmas. Bei Patienten mit Prostatakarzinom lagen die Konzentrationen dagegen im Normalbereich.

Die Untersuchungen an Prostatageweben ergaben in Adenomgewebe ebenfalls eine signifikant höhere LF-Konzentration gegenüber Karzinomgewebe.

Bei entzündlichen Erkrankungen des Urogenitalbereichs lag eine erhöhte LF-Plasmakonzentration vor, eine statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte wegen der geringen Fallzahlen nicht.

MATERIALIEN

Chemikalien

Diese stammten von den Firmen Behring AG, Marburg; Boehringer GmbH, Mannheim; Deutsche Pharmacia, Freiburg; Roth KG, Karlsruhe; Serva GmbH, Heidelberg; Merck AG, Darmstadt;

Proben

Blutplasma stammte von gesunden Mitarbeitern der Institute der medizinischen Fakultät, LMU-München; sowie von Patienten der Urologischen Polikliniken der Universitätskliniken München Großhadern und Pettenkoferstraße.

Humansperma stammte von Patienten der Dermatologischen Universitätsklinik München, Frauenlobstraße.

Prostatagewebe stammte von Patienten der Urologischen Poliklinik, Pettenkoferstraße, sowie der Urologischen Abteilung des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder, München

Das Probenmaterial wurde freundlicherweise von Herrn Prof.Schill, Frau Dr.U.Kästner und Herrn Dr.P.Schulz zur Verfügung gestellt.

Die Zellkulturen stammten von Dr.F.Fittler, Institut für Physiologische Chemie München.

ABKÜRZUNGEN

Enzyme

AP	Alkalische Phosphatase (E.C.3.1.3.1.)
PGK	Phosphoglyceratkinase (E.C.2.7.2.3.)
DNase	Deoxyribonuclease (E.C.3.1.3.35)
RNase	Ribonuclease (E.C.3.1.4.23)

Chemikalien

ATP, ADP, AMP	Adenosinphosphate
CTP, CMP	Cytidinphosphate
ATP-Mg	Adenosintriphosphat-Mg ²⁺
SDS	Natriumdodecylsulfat
TMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
ATP-Sepharose	ATP-ribosyl-adipoyl-dihydrazo-Sepharose
SDS-PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter Zusatz von SDS
LF	Lactoferrin

Sonstiges

n	Anzahl der Versuche
SD	Standardabweichung
$\bar{x}$	Mittelwert
TNM-System	Schema zur Einteilung von Tumoren; T = Infiltrationsgrad; N = Lymphknotenbefall; M = Metastasen
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
BSA	Bovine Serum Albumin
IgG	Immunglobulin G
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Aisen P. and Leibman A. (1972)
Lactoferrin and Transferrin: A Comparative Study
Biochim. Biophys. Acta 257, 314-323
- 2 Ambruso D.R., Johnston R.B. (1981)
Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions, and an enzymatic generating system
J. Clin. Invest. 67, 352-360
- 3 Arnold R., Cole M.F., McGhee J.R. (1977)
A Bactericidal Effect for Human Lactoferrin
Science 197, 263-265
- 4 Avrameas S. (1969)
Coupling of Enzymes to Proteins with Gluteraldehyde
Immunochemistry 6, 43-52
- 5 Banyard M.R.C., McKenzie H.A. (1982)
The fractionation and characterisation of bovine tear proteins, especially lactoferrin
Molecular and Cellular Biochemistry 47, 115-124
- 6 Beisenherz G., Boltze H.J., Bücher Th., Czok R., Garbade K.H., Meyer-Arendt E. und Pfeleiderer G. (1953)
Diphosphofructo-Aldolase,
Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang
Z.F. Naturf., 8b, 555-567

- 7 Benini L., Agostini B., Vaona B., Brocco G., Vantini G., (1985)
Plasma Levels of Lactoferrin in Children Suffering from Cystic Fibrosis
Digestion 31, 200-204
- 8 Bennett R.M., Mohla Ch. (1976)
A solid-phase radioimmunoassay for the measurement of lactoferrin in human plasma: Variations with age, sex and disease
J. Lab. Clin. Med. 88, Nr.1, 156-166
- 9 Bennett R.M. and Kokocinski T. (1978)
Lactoferrin Content of Peripheral Blood Cells
British Journal of Haematology 39, 509-521
- 10 Bennett R.M. and Kokocinski Th. (1979)
Lactoferrin turnover in man
Clinical Science 57, 453-460
- 11 Bennett R.M., Davis J. (1982)
Lactoferrin interacts with deoxyribonucleic acid: a preferential reactivity with double-stranded DNA and dissociation of DNA-anti-DNA complexes
J. Lab. Clin. Med., 99, Nr.1, 129-138
- 12 Bennett R.M., Davis J., Campbell St., Portnoff S. (1983)
Lactoferrin Binds to Cell Membrane DNA
J. Clin. Invest. 71, 611-618

- 13 Bezwoda W.R., Derman D.P., See N., Mansoor N. (1985)
Relative Value of Oestrogen Receptor Assay, Lactoferrin Content, and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity as Prognostic Indicators in Primary Breast Cancer
Oncology 42, 7-12
- 14 Bezwoda W.R., Baynes R.D., Mansoor K., Mansoor N. (1985)
Enzyme linked immunosorbent assay for lactoferrin. Plasma and tissue measurements
Clin. Chim. Acta 151, 61-69
- 15 Birgens H.S., Karle H., Hansen N.E. and Kirstensen L.O. (1984)
The biological significance of lactoferrin in haematology
Scand. J. Haematol. 33, 225-230
- 16 Birgens H.S. (1985)
Lactoferrin in plasma measured by an ELISA-technique: Evidence that plasma lactoferrin is an indicator of neutrophil turnover and bone marrow activity in acute leucaemia
Scand. J. Haematol. 34, 326-331
- 17 Bläckberg L., Hernell O. (1980)
Isolation of Lactoferrin from human whey by a single chromatographic step
FEBS LETTERS 190, 180-183
- 18 Boesman-Finkelstein M. and Finkelstein R.A. (1982)
Sequential purification of lactoferrin, lysozyme and secretory immuno- globulin A from human milk
FEBS LETTERS 144, Nr.1, 1-4

- 19 Breton-Gronius J., Jason D., Buriot D., Vilde j., Griscelli C. (1980)
Lactoferrin deficiency as a consequence of a lack of specific granules in neutrophils from a patient with recurrent infections
AM J. Pathol 99, 413-9

- 20 Brown J.P., Hewick R.M., Hellström I., Doolittle R.F. (1982)
Human melanoma-associated antigen p97 is structurally and functionally related to transferrin
Nature 269, 171-173

- 21 Brown R.D., Rickard K.A. and Kronenberg H. (1983)
Immunoradiometric Assay of Plasma Lactoferrin
Pathology 15, 27-31

- 22 Broxmeyer H.E., Gentile P., Bognacki J. and Ralph P. (1983)
Lactoferrin, Transferrin and Acidic Isoferritins: Regulatory Molecules with Potential Therapeutic Value in Leukemia
Blood Cells 9, 83-105

- 23 Bücheler E., Friedmann G., Thelen M., (1983)
Real-time-Sonographie des Körpers
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York

- 24 Cautrecasas P. and Halenberg M. (1976)
Membrane Receptor in Hormone Action
Adv. Protein Chem. 30, 251-451

- 25 Colomb E., Estevenon JP., Figarella C., Guy O. (1974)
Characterisation of an additional protein in pancreatic
juice of men with chronic calcifying pancreatitis,
identification to lactoferrin
Biochim. Biophys. Acta 342, 306-312

- 26 Engvall E. (1980)
Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT
Methods in Enzymology 70, 419-439

- 27 Estevenon JP., Sarles H., Figarella C. (1975)
Lactoferrin in the duodenal juice of patients with chronic
calcifying pancreatitis
Scand. J. Gastroent. 10, 327-330

- 28 Estevenon J.P. and Figarella C. (1983)
A non competitive enzyme immunoassay of human lactoferrin in
biological fluids
Clinica Chimica Acta 129, 311-318

- 29 Feeney R.E., Komatsu St.K. (1966)
The Transferrins
Struct. Bonding 1, 149-206

- 30 Grayhack J.T., Chung Lee M.D., Kolbusz W., Oliver L. (1980)
Detection of Carcinoma of the Prostate Utilizing Biochemical
Observations
Cancer 45, Nr.7, 1896-1901

- 31 Grayhack J.T., Wendel E.F., Oliver L., Chung Lee (1979)
Analysis of Specific Proteins in Prostatic Fluid for
Detecting Prostatic Malignancy
The Journal of Urology 121, 295-299

- 32 Gutteberg T.J., Haneberg B. and Jorgensen T. (1984)
The latency of serum acute phase proteins in meningococcal
septicemia, with special emphasis on lactoferrin
Clin. Chim. Acta 136, 173-178

- 33 Hastak S.M., Gammelgaard I., Holm H.H., (1982)
Ultrasonically guided transperineal biopsy in the diagnosis
of prostatic carcinoma
J. Urol. 128, 69-73

- 34 Hegnhøj J., Ove B., Muckadell (1985)
An enzyme linked immunosorbent assay for measurement of
lactoferrin in duodenal aspirates and other biological
fluids
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 45, 489-495

- 35 Hoffer P.B., Miller-Catchpole R., Turner D.A. (1979)
Demonstration of Lactoferrin in Tumor Tissue from Two
Patients with Positive Gallium Scans
The Journal of Nuclear Medicine 20, Nr.5, 424-427

- 36 Hurlimann J., Licha M., Ozzello L. (1976)
In Vitro Synthesis of Immunoglobulins and Other Proteins by
Dysplastic and Neoplastic Human Mammary Tissues
Cancer Research 36, 1284-1292

- 37 Jacobs A., Worwoal M. (1980)
Iron in Biochemistry and Medicine, II
Academic Press 610-611

- 38 Kunitz M. (1946)
J. Biol. Chem. 164, 563

- 39 Kuntz G.W.K., Eber St., Kessler W., Krietsch H. und Krietsch W.K.G. (1978)
Isolation of Phosphoglycerate Kinases by Affinity Chromatographie
Eur. J. Biochem. 85, 493-501
- 40 Kuntz G.W.K. (1985)
Affinitäts-Chromatographische Isolierung und Charakterisierung von Phosphoglyceratkinasen verschiedenen Ursprunges
Dissertation, LMU München, Med. Fakultät
- 41 Laemli U.K. (1970)
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4
Nature 227, 680
- 42 Law B.A., Reiter B. (1977)
The isolation and bacteriostatic properties of Lactoferrin from Bovine milk whey
J. Dairy Res., 44, 595
- 43 Lönnerdal B., Carlsson J., Porath J. (1977)
Isolation of Lactoferrin from Human Milk by Metal-Chelate Affinity Chromatography
FEBS LETTERS 75, Nr.1, 89-92
- 44 Loisillier F., Burtin P. and Grabar P. (1968)
Isolement et caracterisation de l'auto-antigene responsable de la formation d'auto-anticorps chez malades atteints de lesions mammaires
Ann. Inst. Pasteur 115, 829

- 45 Mach J.P., Fritsche R., Phan M., Ozzello L., Stjernsward J.
(1977)
Search for Biological Markers in Breast Cancer
Breast Cancer 91-108
- 46 Maneva A., Sirakov L.M. (1982)
Lactoferrin Binding to Cells Isolated from Human Colostrum
studia biophysica 92, 35-43
- 47 Mason D.Y., Taylor C.R., (1978)
Distribution of transferrin, ferritin and lactoferrin in
human tissues
J.Clin.Pathol. 31, 316-327
- 48 Masson P.L., Heremans J.F., Dive C. (1966)
An iron binding protein common to many external secretions.
Clin. Chim. Acta 14, 735-739
- 49 Mühlbacher Ch. (1980)
Isolierung und Charakterisierung der somatischen
Phosphoglyceratkinase aus Mäuseskelettmuskel und Vergleich
zweier alleler Isoenzyme
Diplomarbeit, LMU München, Naturwiss. Fak.
- 50 Nicolai J.J., Teunen F., Zuyderhoudt F., Hoek F. (1984)
Lactoferrin in Pure Pancreatic Juice
Gastroenterology 19, 765-769
- 51 Nie N.H., Hull C.H., Jenkins J.G. (1975)
SPSS: Statistical Package for the Social Sciences
Electronic Computer System

- 52 Otnaess A., Meberg A. and Sande H.A. (1983)
Plasma Lactoferrin Measured by an Enzyme-Linked
Immunosorbent Assay
Scand. J. Haematol. 31, 235-240
- 53 Querinjean P., Masson P.L. and Heremans J.F. (1971)
Molecular Weight, Single-Chain Structure and Amino Acid
Composition of Human Lactoferrin
Eur. J. Biochem. 20, 420-425
- 54 Rossiello R., Carriero M.V. Giordano G.G. (1984)
Distribution of ferritin, transferrin and lactoferrin in
breast carcinoma tissue
J. Clin. Pathol. 37, 51-55
- 55 Schaefer K.M., (1951)
Elektrophoretische Untersuchungen zum Milcheiweis Problem
Monatsschrift Kinderheilkunde 99, 66-71
- 56 Soerensen M., Soerensen S.P.L., (1939)
The Proteins in Whey
C R Trav. Lab. Carlsberg 23, 55-99
- 57 Sykes J., Thomas M., Goldie D.J., Turner G.M. (1982)
Plasma lactoferrin levels in pregnancy and cystic fibrosis
Clin. Chim. Acta 122, 385-393
- 58 Torres A.R., Peterson E.A., Evans W.H., Mage M.G. and Wilson
S.M. (1979)
Fractionation of Granule Proteins of Granulocytes by Copper
Chelate Chromatography
Biochim. Biophys. Acta 576, 385-392

- 59 Valnes K., Brandtzaeg P., Elgio K., Stave R., (1984)
Specific and nonspecific humoral defense factors in the
epithelium of normal and inflamed gastric mucosa
Gastroenterology 86, 402-412

- 60 Van Sande M., Van Camp K. (1981)
Lactoferrin in human prostate tissue
Urol. Res. 9, 241-244

- 61 Van Snick J.L., Masson P.L. (1976)
The binding of human lactoferrin to mouse peritoneal cells
J. Exp. Med. 144, 1568-1580

- 62 Van Snick J.L., Masson P.L., Heremans J.F. (1974)
The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute
inflammation
J. Exp. Med. 140, 1068-1084

- 63 Wang H.S., Chan W.Y., Kloer H.U. (1984)
Comparative Studies on the Chemical and Immunochemical
Properties of Human Milk, Human Pancreatic Juice and Bovine
Milk Lactoferrin
Comp. Biochem. Physiol. 78B, 575-580

- 64 Watanabe T., Nagura H., Watanabe K. and Brown W.R. (1984)
The binding of human milk lactoferrin to immunoglobulin A
FEBS LETTERS 168, Nr.2 203-207

- 65 Weinberg E.D. (1978)
Iron and Infection
Microbiological Rev. 42, Nr.1, 45-66

- 66 Winterbourn C.C. (1983)
Lactoferrin-catalyzed hydroxyl radical production.
Additional requirement for a chelating agent
Biochem. J. 210, 15-19
- 67 Wurster K., Heberling D., Rapp W. (1980)
CEA und Laktoferrin bei gutartigen und bösartigen
Erkrankungen der Mamma
Geburtsh. u. Frauenheilk. 40, 412-422
- 68 Yuen E., Gibson J., Brown R.D., Rickard K.A., Kronenberg H.
(1985)
Serum Lactoferrin in Polycythemia
Pathology 17, 127
- 69 Zampella E.J., Bradley E.L., Pretlow T.G. (1982)
Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: A Possible Clinical
Indicator for Prostatic Carcinoma
American Cancer Society 49, 384-387

L E B E N S L A U F

Von	Christa Mühlbacher Nickl , geb. Mühlbacher
geboren:	am 27.09.1953 in München.
Vater:	Hans Georg Mühlbacher, Fachstudienrat
Mutter:	Charlotte Mühlbacher, Hausfrau
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand:	Verheiratet
Ausbildungsdaten:	
1959	Einschulung in die Grundschule an der Schwindstraße in München.
1973	Abitur, abgelegt am Städt. Sophie Scholl Gymnasium München
1973 - 1978	Studium der Diplom Biologie an der LMU-München.
1980	Diplomarbeit Biologie mit dem Thema: "Isolierung und Charakterisierung der somatischen Phosphoglyceratkinase aus Mäuseskelettmuskel und Vergleich zweier alleler Isoenzyme."
1983	Publikation über dieses Thema im Biochemical Genetics.
seit 1978	Studium der Humanmedizin an der LMU-München.
seit 1982	Medizinische Dissertation: Biochemische Arbeiten über Lactoferrin, ein eisenbindendes Sekretglobulin.
1984 / 1985	Praktisches Jahr
April 1985	III.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.
Mai 1985	Approbation
seit Okt. 1985	Assistenzärztin der III. Medizinischen Abteilung des Krankenhauses München Schwabing.
Oktober 1986	Eheschließung mit Herrn Rainer Nickl, Architekt.

